

Eine kritische Evaluierung FRET-basierter Biosensoren als Werkzeuge für die quantitative Metabolitanalytik

Roland Moussa

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio- und Geowissenschaften (IBG)
Biotechnologie (IBG-1)

Eine kritische Evaluierung FRET-basierter Biosensoren als Werkzeuge für die quantitative Metabolitanalytik

Roland Moussa

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 54

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-792-4

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten
sind im Internet über <<http://dnb.d-nb.de>> abrufbar.

Herausgeber und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek, Verlag
D-52425 Jülich
Telefon (02461) 61-5368 · Telefax (02461) 61-6103
E-Mail: zb-publikation@fz-juelich.de
Internet: <http://www.fz-juelich.de/zb>

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2012

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health Band / Volume 54

D 61 (Diss. Düsseldorf, Univ., 2012)

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-792-4

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter <http://www.fz-juelich.de/zb/juwel>

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Danksagung

Mein Dank gilt Professor Dr. Martina Pohl und Professor Dr. Michael Bott für die Begutachtung dieser Dissertation.

Professor Dr. Wolfgang Wiechert danke ich besonders für Möglichkeit am Institut für Bio- und Geowissenschaften (IBG-1: Biotechnologie) zu promovieren.

Da die Arbeit am IBG-1 des Forschungszentrums Jülich angefertigt wurde, möchte ich mich auch dort bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt dabei:

Martina Pohl für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit als Mitglied ihrer Forschungsgruppe anzufertigen. Ihre Fachkenntnis und persönlich sehr herzliche Art haben mir in diesem Promotionsprojekt sehr viel Sicherheit gegeben.

Meinem Institutsleiter Wolfgang Wiechert danke ich für das in mich gesetzte Vertrauen, die umfassende Unterstützung bei diesem Thema und seine stets motivierende Art.

Lilia Arnold will ich für ihre Unterstützung im FPLC Labor und die vielen freundschaftlichen Gesten danken.

Ich danke Anna Baierl für die gewissenhafte und ausgezeichnete Bachelorarbeit, die sie im Rahmen meines Promotionsprojekts angefertigt hat.

Victoria Steffen, deren Arbeit an mein Projekt schließen wird, danke ich für die hoch-motivierte Zusammenarbeit.

Meinen Kollegen Daniel Okrob, Justyna Kulig, Robert Westphal, Álvaro Gomez Baraibar, Daniel Jussen und Tina Gerhards danke ich für ihre engagierte Unterstützung auf fachlicher und freundschaftlicher Ebene.

Professor Dr. Marco Oldiges danke ich für viele interessante Gespräche und seine Ratschläge im Bereich der Metabolomics.

Der gesamten Arbeitsgruppe Biokatalyse und Biosensoren, für das überdurchschnittlich-positive Arbeitsklima, die angenehme Zusammenarbeit und die beständige Hilfsbereitschaft.

Für die gute Kooperation innerhalb des Forschungszentrums danke ich zudem Dr. Thomas Drepper und Janko Potzkei (IMET) und Dr. Thomas Gensch (ICS-4).

Abschließend gilt mein besonderer Dank meinen Eltern Elias und Najah Moussa, die mir das Studium ermöglicht und mich immer bedingungslos unterstützt haben.

Meiner Frau Carolin und meiner Tochter Sophie danke ich für ein Zuhause, in das ich immer zurückkehren konnte, um Bestätigung, Motivation und neue Kraft zu erhalten.

Inhaltsverzeichnis

I.	Abstract	6
II.	Kurzfassung.....	7
III.	Abkürzungsverzeichnis	8
IV.	Abbildungsverzeichnis.....	9
V.	Tabellenverzeichnis	13
1	Einleitung	14
1.1	<i>Grundlagen der Fluoreszenz</i>	<i>14</i>
1.1.1	Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)	16
1.1.2	Fluoreszenzlebensdauer Messungen	17
1.2	<i>Fluoreszierende Proteine</i>	<i>18</i>
1.2.1	Das Grün fluoreszierende Protein (GFP) aus <i>Aequorea victoria</i>	18
1.2.2	Flavin-mononucleotid-basiertes Fluoreszenzprotein (FbFP)	20
1.3	<i>Periplasmatische Bindeproteine</i>	<i>21</i>
1.3.1	D-Galactose/ D-Glucose-Bindeprotein (GGBP)	22
1.3.2	Maltose-Bindeprotein (MBP)	23
1.4	<i>Genetisch kodierte FRET-Biosensoren</i>	<i>24</i>
1.5	<i>Makromolecular Crowding</i>	<i>27</i>
2	Zielsetzung	31
3	Ergebnisse und Diskussion.....	33
3.1	<i>Charakterisierung der gereinigten Sensorproteine.....</i>	<i>33</i>
3.1.1	Kultivierung Biosensoren.....	33
3.2	<i>Charakterisierung der Biosensoren und Fluoreszenzproteine</i>	<i>35</i>
3.2.1	Einfluss des pH-Werts auf das Sensorsignal	35
3.2.2	Einfluss der Ionenstärke auf das Sensorsignal	38
3.2.3	Einfluss verschiedener Puffersalze auf das Sensorsignal	39
3.2.4	Einfluss von Salzen und Spurenelementen auf das Sensorsignal.....	40
3.2.5	Einfluss verschiedener Zellmetabolite auf das Sensorsignal	44

3.2.6	Messungen in <i>E. coli</i> Rohzelleextrakt	52
3.2.7	Einfluss von <i>molecular crowding</i> auf die Affinität der Biosensoren.....	55
3.2.8	<i>EcFbFP</i> als alternativer FRET-Donor	63
3.2.9	Neue Sensorkonstrukte	67
3.2.10	Photophysikalische Beobachtungen.....	70
4	Zusammenfassende Diskussion und Ausblick	73
5	Material und Methoden	78
5.1	Geräte	78
5.2	Chemikalien	80
5.3	Medien, Puffer und Lösungen.....	81
5.4	Biologisches Material.....	85
5.5	Kultivierung und Reinigung der Biosensor-Proteine	90
5.6	Analytik	93
6	Anhang.....	100
7	Erklärung.....	105
8	Literaturverzeichnis.....	107

I. Abstract

In the recent years, a huge set of genetically-encoded fluorescence biosensors has been developed, allowing the detection of signaling intermediates and metabolites in real time with subcellular spatial resolution. Many of these biosensors are based on Foerster Resonance Energy Transfer (FRET). They represent the basis for numerous non-invasive cell-based assays to monitor signal transduction in living cells. The two FRET-based biosensors used in this work are composed of periplasmatic binding proteins from *E. coli* (PBP) fused to two derivatives of the green fluorescent protein (GFP) at the C- and N-terminus, respectively. Structural changes of the PBPs in such “venus-flytrap” sensors upon metabolite binding alter the relative orientation and/or distance between both terminal fluorescent proteins thereby changing the FRET signal.

Specifically two well established sugar sensors for maltose- (FLIPmal25 μ) and glucose detection (FLII12Pglu-700 μ Δ 6) were investigated (Fehr, Frommer et al. 2002; Deuschle, Okumoto et al. 2005), which have already been used in several mammalian-, lower eukaryotic-, bacterial- and plant cells (Bermejo, Haerizadeh et al. 2011; Hou, Takanaga et al. 2011).

In order to evaluate both biosensors as *in vivo* tools for quantitative metabolite analyses the effects of varied environmental conditions of biochemically essential parameters on the signal intensity and the K_d -value of both biosensors and on the single fluorescence proteins were thoroughly studied in this PhD-project. Specifically the influences of pH, buffer salts, ionic strength, temperature and several intracellular metabolites were studied. Further, investigations with different molecular crowding agents such as polyethyleneglycol and Ficoll demonstrated that the sensor specific parameters are also influenced by the viscosity of the medium.

The results demonstrate that both biosensors are significantly affected by numerous of the tested parameters. Almost all micro-environmental variations led to considerably different FRET-signals or K_d -values, because either the fluorescent proteins or the binding domain are affected by the tested parameters.

As a consequence, the common practice to apply such sensors for quantitative *in vivo* measurements based on an *in vitro* calibration in an arbitrarily chosen buffer system can easily result in false concentration determination *in vivo*, because of the multiple influence factors in living cells, which cannot be controlled.

II. Kurzfassung

In den letzten 10 Jahren wurden zahlreiche genetisch kodierte Fluoreszenz-Biosensoren entwickelt, mit dem Ziel nicht-invasiv die Präsenz verschiedenster Metabolite kontinuierlich und in Echtzeit mit räumlicher Auflösung innerhalb lebender Zellen nachzuweisen. Das Messsignal vieler dieser Biosensoren basiert auf einer Veränderung der Intensität eines Förster Resonanz Energietransfers (FRET). Die beiden FRET-basierten Biosensoren, die in diesem Promotionsprojekt verwendet wurden, bestehen aus periplasmatischen Bindedomänen von *E. coli*, an die C- und N-terminal Farbvarianten des Grün-Fluoreszierenden Proteins (GFP) fusioniert wurden. Durch eine Konformationsänderung der Proteinstruktur der Bindedomänen, die bei Ligandenbindung auftritt, verändert sich die räumliche Distanz und Orientierung der Fluoreszenzproteine zueinander nach dem Prinzip einer Venus-Fliegenfalle. Als Folge kommt es zu einer Veränderung der FRET-Signalintensität, die als direkter Nachweis für die Anwesenheit des Liganden angesehen werden kann.

In dieser Arbeit wurden zwei Zuckersensoren für Glucose und Maltose untersucht (Fehr, Frommer et al. 2002; Deuschle, Okumoto et al. 2005), die bereits in verschiedenen Organismen zur *in vivo*-Quantifizierung eingesetzt wurden (Bermejo, Haerizadeh et al. 2011; Hou, Takanaga et al. 2011).

Um beide Sensorkonstrukte als Werkzeuge für die quantitative Metabolitanalytik zu evaluieren, wurde der Einfluss einer Vielzahl von Umgebungsbedingungen auf die FRET-Signalintensität und den K_d -Wert der Sensoren und auf die einzelnen Fluoreszenzproteine getestet. Speziell untersucht wurden folgende Parameter: pH, Puffersalze, Ionenstärke, Temperatur und verschiedene essenzielle intrazelluläre Metabolite. Untersuchungen mit molekularen *crowdern*, wie Polyethylenglycol, Ficoll und BSA zeigten, dass auch die Viskosität des Mediums Einfluss auf die Sensor-spezifischen Parameter nehmen.

Die Resultate zeigen, dass die Signalantwort beider Biosensoren durch die Umgebungsbedingungen in unterschiedlichem Maße beeinflusst wird, was häufig zu signifikant unterschiedlichen FRET-Signalen und K_d -Werten führt, da sowohl die als Fluorophore der verwendeten GFP-Varianten als auch die Bindedomänen beeinflusst wurden.

Aus den Ergebnissen ist abzuleiten, dass die gängige Praxis der *in vitro* Kalibrierung dieser Sensoren in willkürlich gewählten Puffersystemen für die quantitative *in vivo* Analytik aufgrund der zahlreichen, sich addierenden Einflussfaktoren mit hoher Wahrscheinlichkeit in falschen Konzentrationsbestimmungen *in vivo* resultiert.

III. Abkürzungsverzeichnis

ABP	- Arabinosebindeprotein	GxP	- Gruppe der Guanosinphosphate
ADP	- Adenosindiphosphat	HBP	- Histidin-bindendes Proteine
AMP	- Adenosinmonophosphat	IPTG	- Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ATP	- Adenosintriphosphat	K _d	- Dissoziationskonstante
AxP	- Gruppe der Adenosinphosphate	kDa	- Kilodalton
BFM	- Biofeuchtmasse	LB	- Lysogeny-Broth-Medium
CFP	- Cyan Fluoreszierendes Protein	LOV	- Light-Oxygen-Voltage
Citrine	- EYFP + weitere Mutation Q69M	<i>malE</i>	- Gen für MBP
CPS	- counts per second	MBP	- Maltose Bindeprotein
ϵ	- Einheit für Extinktionskoeffizient	<i>mgIB</i>	- Gen für GGBP
<i>E. coli</i>	- <i>Escherichia coli</i>	NADxx	- Gruppe der Nicotinamadenindinukleotide
<i>EcFbFP</i>	- FbFP aus <i>E. coli</i>	NMR	- Kernspinresonanzspektroskopie
ECFP	- Enhanced CFP	PBP	- Periplasmatisches Bindeprotein
EDTA	- Ethylendiamintetraessigsäure	PEG	- Polyethylenglycol
EYFP	- Enhanced YFP	PMT	- Photomultiplier
FbFP	- FMN-basiertes Fluoreszenzprotein	TCSPC	- time-correlated single photon counting
FMN	- Flavinmononukleotid	QY	- Quantenausbeute
FPLC	- Fast Protein Liquid Chromatography	upm	- Umdrehungen pro Minute
FRET	- Förster Resonanz Energietransfer	w/vol	- weight per Volume
GFP	- Grün Fluoreszierendes Protein	YFP	- Gelb Fluoreszierendes Protein
GGBP	- Galactose/Glucose Bindeprotein		

IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Die Stokes Verschiebung bezeichnet die Differenz der Wellenlängen zwischen ein- und ausgehenden Photonen bei Lumineszenz-Effekten.....	14
Abbildung 1-2: Jablonski-Termschema für die Illustration der Energiezustände eines Fluorophors.....	15
Abbildung 1-3: Jablonski-Termschema für die schematische Darstellung der Energieübergänge bei FRET.....	16
Abbildung 1-4: Beispielspektren für die erforderliche spektrale Überlappung bei FRETs.....	17
Abbildung 1-5: 3D-Strukturen von Aequorin (blau: 1EJ3) und GFP (grün: 1GFL).....	18
Abbildung 1-6: Faserstruktur des Grün Fluoreszierenden Proteins.....	19
Abbildung 1-7: Vorschlag der autokatalytischen Chromophor-Reifung des GFP.....	19
Abbildung 1-8: Einige Chromophor-Varianten als Beispiel für die Farbvielfalt, die durch die Mutation des GFP erreicht werden konnten.....	20
Abbildung 1-9: a) 3D-Struktur des YtvA LOV-Wildtypproteins von <i>Bacillus subtilis</i> ; hier dargestellt als Monomer (2PR5)..	21
Abbildung 1-10: Phylogenetische Darstellung der Verwandtschaft zwischen den Superfamilien verschiedener periplasmatischer Bindeproteine.....	22
Abbildung 1-11: Quartärstruktur des D-Galactose/D-Glucose-Bindeproteins (GGBP) a) ohne Ligand (PDB: 2FW0) und b) mit D-Glucose (PDB: 2FVY).....	23
Abbildung 1-12: Quartärstruktur des Maltose-Bindeproteins (MBP) a) ohne Liganden (PDB: 1OMP) und b) mit Maltose (PDB: 1ANF).....	23
Abbildung 1-13: Schematische Darstellung zur Funktionsweise der verwendeten FRET-basierten Biosensoren.....	24
Abbildung 1-14: Glucose-Titrationskurven von drei verschiedenen Glucosesensoren.....	25
Abbildung 1-15: Beispielhafte Darstellung einer <i>in vitro</i> Titrationskurve eines FRET-basierten Biosensors, zur Erklärung der zentralen Begriffe und Kennzahlen.....	26
Abbildung 1-16: Schematischer Aufbau der beiden FRET-basierten Biosensoren.....	27
Abbildung 1-17: Das gedrängte Zellinnere. Eine 3D-Rekonstruktion durch Kryo-Elektronentomografie zeigt einen Teil des Cytoplasmas einer <i>Dictyostelium discoideum</i> -Zelle.....	29
Abbildung 1-18: Schematische Darstellung zweier Typen künstlicher <i>crowding agents</i>	29
Abbildung 1-19: Illustration des Volumenausschlusseffekts.....	30
Abbildung 2-1: Allgemeines Schema zur Charakterisierung der Biosensoren in dieser Arbeit.....	32
Abbildung 3-1: Emissionsspektren der Kultivierungsbrühe als Indikator für den Reifungszustand der GFP-Derivate CFP und YFP im Glucosesensor.....	33
Abbildung 3-2: Chromatogramm einer Affinitätschromatographischen Reinigung des Donorproteins ECFP.....	34
Abbildung 3-3: Schema des experimentellen Ablaufs einer <i>in vivo</i> Anwendung von FRET-basierter Biosensoren.....	35
Abbildung 3-4: Titrationskurven a) des Glucosesensors und b) des Maltosesensors bei unterschiedlichen pH-Werten.....	36
Abbildung 3-5: Fluoreszenzemissionsspektren des Donorproteins ECFP bei verschiedenen pH-Werten in 20 mM MOPS Puffer bei 25 °C.....	37
Abbildung 3-6: Fluoreszenzemissionsspektren der Akzeptorproteine a) Citrine und b) EYFP bei verschiedenen pH-Werten in 20 mM MOPS Puffers bei 25 °C.....	37

Abbildung 3-7: Titrationskurven a) des Glucosensors und b) des Maltosensors bei unterschiedlichen Konzentrationen des MOPS Puffers.....	38
Abbildung 3-8: Fluoreszenzemissionsspektren des Donorproteins ECFP in MOPS Puffern verschiedener Konzentration bei 25 °C.	39
Abbildung 3-9: Fluoreszenzemissionsspektren der Akzeptorproteine a) Citrine und b) EYFP in MOPS Puffern verschiedener Konzentration bei 25 °C.	39
Abbildung 3-10: Kalibration des Glucosensors a) und des Maltosensors b) in verschiedenen Puffern.....	40
Abbildung 3-11: Konzentrationsabhängiger Einfluss der Salze NaCl, CaCl ₂ , MgCl ₂ , KCl, NH ₄ Cl, MnCl ₂ und NaP _i auf die FRET-Signalintensität des Glucosensors.	42
Abbildung 3-12: Konzentrationsabhängiger Einfluss der Salze NaCl, CaCl ₂ , MgCl ₂ , KCl, NH ₄ Cl, MnCl ₂ , und NaPi auf die FRET-Signalintensität des Maltosensors.....	42
Abbildung 3-13: Einfluss verschiedener Konzentrationen der Salze NaCl, CaCl ₂ , MgCl ₂ , KCl, NH ₄ Cl, MnCl ₂ , und NaPi auf die Fluoreszenzemission von ECFP.	43
Abbildung 3-14: Einfluss verschiedener Konzentrationen der Salze NaCl, CaCl ₂ , MgCl ₂ , KCl, NH ₄ Cl, MnCl ₂ , und NaPi auf die Fluoreszenzemission von a) EYFP und b) Citrine.	43
Abbildung 3-15: Einfluss von AMP, ADP und ATP auf die FRET-Signalintensität des Glucose- a), b) und Maltosensors c), d).	44
Abbildung 3-16: Einfluss verschiedener Konzentrationen von a) AMP, b) ADP und c) ATP auf die Fluoreszenzemission von ECFP, EYFP und Citrine.	45
Abbildung 3-17: Einfluss von NAD ⁺ , NADH, NADP ⁺ und NADPH auf die FRET-Signalintensität des Glucose- a), b) und Maltosensors c), d).....	46
Abbildung 3-18: Konzentrationsabhängiger Einfluss von a) NAD ⁺ und b) NADH auf die Fluoreszenzemission von ECFP, EYFP und Citrine.....	48
Abbildung 3-19: Anregungs- und Emissionsspektren von ECFP (blau) und EYFP bzw. Citrine (rot). Zudem das Emissionsspektrum von NADH nach Anregung bei 428 nm (grün).	49
Abbildung 3-20: Konzentrationsabhängiger Einfluss der getesteten Nicotinamidadeninukleotidphosphate a) NADP ⁺ und b) NADPH auf die Fluoreszenzemission von ECFP, EYFP und Citrine.....	50
Abbildung 3-21: Einfluss von cGMP und GTP auf die FRET-Signalintensität des Glucose- a)+b) und Maltosensors c)+d).....	51
Abbildung 3-22: Konzentrationsabhängiger Einfluss von a) GTP und b) cGMP auf die FRET-Signalintensität der Fluoreszenzproteine ECFP, EYFP und Citrine.....	52
Abbildung 3-23: Absorptionsspektren verschiedener Konzentrationen des Glucosensors (0,01 – 0,7 mg·mL ⁻¹) in Rohzelleextrakt von <i>E. coli</i> BL21 (DE3).	53
Abbildung 3-24: Suspensionen an <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Rohzelleextrakten mit verschiedener Biofeuchtmasskonzentration (w/v) resuspendiert und aufgeschlossen in MOPS Puffer.	54
Abbildung 3-25: Zeitaufgelöste Messung des Maltosensors in <i>E. coli</i> Rohextrakt (10 % w/vol) in 20 mM MOPS pH 7,3; 25 °C.	54
Abbildung 3-26: Enzymkaskade zum Abbau von Maltose in <i>E. coli</i> BL21 (DE3).	55
Abbildung 3-27: a) Titrationskurven des Glucosensors in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Polyethylenglycol mit dem mittleren Molekulargewicht von 2.000 Da (2,5 - 15 % w/v) im Vergleich zur Pufferkontrolle (20 mM MOPS).....	56

Abbildung 3-28: Titrationskurve des Maltosesensors in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Polyethylenglycol mit dem mittleren Molekulargewicht von 2.000 Da (2,5 - 15 % w/v) im Vergleich zur Pufferkontrolle (20 mM MOPS).	57
Abbildung 3-29: Der Glucosesensor mit unterschiedlichen Konzentrationen von Polyethylenglycol mit dem mittleren Molekulargewicht von 5.000 Da (2,5 - 15 %) und der Pufferkontrolle (20 mM MOPS).	57
Abbildung 3-30: Der Maltosesensor mit unterschiedlichen Konzentrationen von Polyethylenglycol der mit dem mittleren Molekulargewicht von 5.000 Da (2,5 - 15 %) und der Pufferkontrolle (20 mM MOPS).	58
Abbildung 3-31: Der Glucosesensor mit unterschiedlichen Konzentrationen von Polyethylenglycol mit dem mittleren Molekulargewicht von 10.000 Da (2,5 - 15 %) und der Pufferkontrolle (20 mM MOPS).	58
Abbildung 3-32: Der Maltosesensor MP24 mit unterschiedlichen Konzentrationen von Polyethylenglycol mit dem mittleren Molekulargewicht von 10.000 Da (2,5 - 15 %) und der Pufferkontrolle (20 mM MOPS).	59
Abbildung 3-33: Der Glucosesensor MP18.1.1 mit unterschiedlichen Konzentrationen von Polyethylenglycol der mit dem mittleren Molekulargewicht von 20.000 Da (2,5 - 15 %) und der Pufferkontrolle (20 mM MOPS).	59
Abbildung 3-34: Der Maltosesensor MP24 mit unterschiedlichen Konzentrationen von Polyethylenglycol mit dem mittleren Molekulargewicht von 20.000 Da (2,5 - 15 %) und der Pufferkontrolle (20 mM MOPS).	60
Abbildung 3-35: Der Glucosesensor MP18.1.1 mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ficoll (2,5 - 15 %) und der Pufferkontrolle (20 mM MOPS). Der pH wurde bei allen Ansätzen auf 7,3 eingestellt.	61
Abbildung 3-36: Der Maltosesensor MP24 mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ficoll (2,5 - 15 %) und der Pufferkontrolle (20 mM MOPS). Der pH wurde bei allen Ansätzen auf 7,3 eingestellt.	61
Abbildung 3-37: Der Glucosesensor MP18.1.1 mit unterschiedlichen Konzentrationen von Bovinem Serumalbumin (BSA; 2,5-15 %) und der Pufferkontrolle (20 mM MOPS).	62
Abbildung 3-38: Der Maltosesensor MP24 mit unterschiedlichen Konzentrationen von Bovinem Serumalbumin (BSA; 2,5 - 15 %) und der Pufferkontrolle (20 mM MOPS).	63
Abbildung 3-39: SDS-Gel nach Affinitäts-chromatografischer Reinigung von <i>EcFbFP</i> (16.5 kDa) und <i>ECFP</i> (30 kDa) (Kapitel 5.6).	64
Abbildung 3-40: Fluoreszenzemissionsspektren der Donorproteine <i>ECFP</i> a) und <i>EcFbFP</i> b) bei verschiedenen pH-Werten in 20 mM MOPS Puffers.	65
Abbildung 3-41: Fluoreszenzemissionsspektren der Donorproteine <i>ECFP</i> a) und <i>EcFbFP</i> b) in verschieden konzentrierten MOPS Puffern.	65
Abbildung 3-42: Einfluss verschiedener Konzentrationen der Salze NaCl, CaCl ₂ , MgCl ₂ , KCl, NH ₄ Cl, MnCl ₂ , und NaPi auf die Fluoreszenzemission der Donorproteine a) <i>ECFP</i> (0,25 mg·mL ⁻¹) und b) <i>EcFbFP</i> (0,5 mg·mL ⁻¹) in 20 mM MOPS Puffer; 25 °C.	66
Abbildung 3-43: Einfluss verschiedener Konzentrationen von AMP, ADP und ATP auf die Fluoreszenzemission der Donorproteine a) <i>ECFP</i> (0,25 mg·mL ⁻¹) und b) <i>EcFbFP</i> (0,5 mg·mL ⁻¹) in 20 mM MOPS Puffer; 25 °C.	66
Abbildung 3-44: Einfluss verschiedener Konzentrationen der Kofaktoren NAD ⁺ , NADP ⁺ , NADH und NADPH auf die Fluoreszenzemission der Donorproteine a) <i>ECFP</i> (0,25 mg·mL ⁻¹) und b) <i>EcFbFP</i> (0,5 mg·mL ⁻¹) in 20 mM MOPS Puffer; 25 °C.	67
Abbildung 3-45: Einfluss verschiedener Konzentrationen der Kofaktoren cGMP und GTP auf die Fluoreszenzemission der Donorproteine a) <i>ECFP</i> (0,25 mg·mL ⁻¹) und b) <i>EcFbFP</i> (0,5 mg·mL ⁻¹) in 20 mM MOPS Puffer; 25 °C.	67
Abbildung 3-46: Emissionsspektrum des gereinigten <i>EcFbFP</i> /Citrate-Glucosesensors nach Anregung bei 450 nm.	68
Abbildung 3-47: Titrationskurve des neuen <i>EcFbFP</i> -Glucosesensors.	68
Abbildung 3-48: Fluoreszenzlebensdauer Messung des Sensorkonstrukts MP18.1.1_ <i>EcFbFP</i> .	69

Abbildung 3-49: Emissionsspektren a) des Glucosensors und b) des Maltosensors in An- und Abwesenheit der Zuckerliganden.....	70
Abbildung 3-50: Fluoreszenzlebensdauer Messung des Donorproteins (ECFP) als Teil des Maltosensors.....	71
Abbildung 3-51: Fluoreszenzlebensdauer Messung des Donorproteins (ECFP) als Teil des Glucosensors.....	71
Abbildung 3-52: Apparatur für Fluoreszenzlebensdauer Messungen im Femtosekunden-Maßstab von Dr. Eduard Fron, KU Leuven.....	72
Abbildung 3-53: Fluoreszenzlebensdauer Messungen des Glucosensors in einer Zeitauflösung bis 1000 Picosekunden.....	73
Abbildung 4-1: Die 3D-Struktur von ECFP (PBD:2WSN). Gut zu erkennen sind zwei Öffnungen in der β -barrel Struktur des GFP-Fasses.....	75
Abbildung 5-1: Schematische Darstellung der verwendeten Biosensor-Vektoren.....	87
Abbildung 5-2: Vektorkarte des pET-Duet-ECFP Vektors.....	87
Abbildung 5-3: Vektorkarte der pRhotHi-2 Vektoren, in die Gene für die isolierten gelben Fluoreszenzproteine kloniert wurden.....	88
Abbildung 5-4: Vektorkarte des pRhotHi-2 Vektors, in den das Gen für das FMN-basierte Fluoreszenzprotein <i>EcFbFP</i> eingebracht wurde.....	89
Abbildung 5-5: Vektorkarte des pRhotHi-2 Vektors, in den die Sequenz für den Glucosensor MP18.1.1, bei dem das ECFP durch das FMN-basierte Fluoreszenzprotein <i>EcFbFP</i> ausgetauscht wurde.....	89
Abbildung 5-6: Sensorvarianten MP18.1.1_ <i>EcFbFP</i> (oben) und MP24_ <i>EcFbFP</i> (unten).....	90
Abbildung 5-7: Schemazeichnung der Durchflusszelle für den Zellaufschluss.....	91
Abbildung 5-8: SDS-Gel von Expressionsproben vor und nach der Reinigung mit Silberfärbung.....	92
Abbildung 5-9: Aufbau der Reader Messtechnik.....	95
Abbildung 5-10: Schematische Darstellung des Pipettierschemas für die Untersuchung des Einflusses von intrazellulären Komponenten auf das Fluoreszenzsignal der Biosensoren und der isolierten Fluoreszenzproteine.....	98
Abbildung 5-11: Schematische Darstellung des Pipettierschemas für die Untersuchung des Einflusses von <i>crowdern</i> auf das Fluoreszenzsignal der Biosensoren.....	99
Abbildung 6-1: Glucosensor (MP18.1.1) kommentierte Proteinsequenz.....	100
Abbildung 6-2: Glucosensor (MP18.1.1) kommentierte Nukleotidsequenz. Angrenzende Standardschnittstellen für Klonierungen sind <i>XbaI</i> und <i>HindIII</i>	100
Abbildung 6-3: Maltosensor (MP24) kommentierte Proteinsequenz.....	101
Abbildung 6-4: Maltosensor (MP24) kommentierte Nukleotidsequenz. Angrenzende Standardschnittstellen für Klonierungen sind <i>BamHI</i> und <i>HindIII</i>	101
Abbildung 6-5: Emissionsspektrum des Maltosensors in 20 mM MOPS (pH 7,3) bei 0,5 mg·mL ⁻¹ nach Anregung bei 428 nm in An- und Abwesenheit von 100 mM Maltose.....	102
Abbildung 6-6: Emissionsspektrum des Glucosensors in 20 mM MOPS (pH 7,3) bei 0,5 mg·mL ⁻¹ nach Anregung bei 428 nm in An- und Abwesenheit von 100 mM Glucose.....	102
Abbildung 6-7: Emissionsspektrum von Citrine in 20 mM MOPS (pH 7,3) bei 0,5 mg·mL ⁻¹ nach Anregung bei 485 nm.	103
Abbildung 6-8: Emissionsspektrum von ECFP in 20 mM MOPS (pH 7,3) bei 0,5 mg·mL ⁻¹ nach Anregung bei 428 nm.	103
Abbildung 6-9: Emissionsspektrum von EYFP in 20 mM MOPS (pH 7,3) bei 0,5 mg·mL ⁻¹ nach Anregung bei 485 nm.	104

V. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Zusammenfassung der 3D-Strukturen periplasmatischer <i>E. coli</i> Bindedomänen.....	22
Tabelle 1-2: Kenndaten der im verwendete FRET-basierten Biosensoren.....	27
Tabelle 3-1: Physiologische Salz- und Spurenelementkonzentrationen in <i>E. coli</i> BL21 (DE3).	41
Tabelle 3-2: Physiologische Konzentrationen von Adenosinmono-, di- und triphosphat in <i>E. coli</i>	45
Tabelle 3-3: Literaturangaben über die physiologischen Konzentrationen von NAD^+ , NADH , NADP^+ und NADPH in <i>E. coli</i>	49
Tabelle 5-1: Liste der verwendeten Geräte.....	78
Tabelle 5-2: Liste der verwendeten Geräte - Fortsetzung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Tabelle 5-3: Liste der verwendeten Chemikalien.....	80
Tabelle 5-4: Autoinduktionsmedium	81
Tabelle 5-5: Zusammensetzung des 1M Kaliumphosphat Puffers.....	81
Tabelle 5-6: Konzentration der Glucoselösung für das Autoinduktionsmedium.	81
Tabelle 5-7: Konzentration der Lactoselösung für das Autoinduktionsmedium.....	81
Tabelle 5-8: Lysogeny-Broth Medium (LB-Medium)	82
Tabelle 5-9: Antibiotika-Stocklösungen, als Lösungsmittel wurde Millipor Wasser verwendet.....	82
Tabelle 5-10: HEPES Puffer	82
Tabelle 5-11: Liste der verwendeten MOPS-Puffer	82
Tabelle 5-12: 20 mM Natriumphosphat Puffer; pH 7,3	83
Tabelle 5-13: Tris-HCl Puffer.....	83
Tabelle 5-14: TAE-Puffer (50x) für Agarose-Gelelektrophorese	83
Tabelle 5-15: TMF Puffer zur Herstellung kompetenter Zellen	83
Tabelle 5-16: Mg^{2+} -Lösung zur Herstellung kompetenter Zellen.....	83
Tabelle 5-17: Stocklösungen und Endkonzentrationen für ATP, ADP, AMP, NAD^+ , NADP^+ , NADH , NADPH , GTP und cGMP..	84
Tabelle 5-18: Stocklösungen und Endkonzentrationen für die Salze NaCl, CaCl_2 , MgCl_2 , KCl, NH_4Cl , MnCl_2 , NaH_2PO_4 . Die	84
Tabelle 5-19: Zucker-Stockkonzentrationen.	85
Tabelle 5-20: Zentrifugationsschritte vor und nach dem Zellaufschluss.....	91
Tabelle 5-21: Schritte der chromatographischen Reinigung mit dem ÄKTApurifier System.	92
Tabelle 5-22 Ansatz für SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	94
Tabelle 5-23: Einstellungen für die Messung der Fluoreszenzintensität von ECFP und EYFP/ Citrine am TECAN M200 Reader	96

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Fluoreszenz

Lumineszenz (lat. lumen = Licht) ist ein Sammelbegriff für sämtliche Photoprozesse, bei denen eine Aussendung von Licht infolge der Abgabe von Energie eines angeregten Zustandes beim Übergang in den Grundzustand resultiert. Da dieses Leuchten nicht durch eine Erhöhung der Temperatur bewirkt wird, spricht man von „kalten Lichtphänomenen“. Zu den bekanntesten Lumineszenz-Effekten gehört die Fluoreszenz, die eine der zentralen Techniken der vorliegenden Arbeit ist.

Das Phänomen der Fluoreszenz beschrieb der irische Physiker Sir Gabriel Stokes bereits im 19. Jahrhundert (Stokes 1853). Er zeigte, dass Substanzen, wie das Mineral Fluorit, nach Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge eine Lichtemission bei höheren Wellenlängen (Rotverschiebung) zeigen. Fluoreszenz ist folglich das durch energiereiche Strahlung angeregte Leuchten eines Stoffes. Der Effekt der Wellenlängenverschiebung wird als Stokessches Gesetz oder Stokes-Verschiebung bezeichnet (**Abbildung 1-1**). Sie ist die Grundlage für Fluoreszenz, deren Name sich vom Mineral Fluorit ableitet. Fluoreszierende Verbindungen werden auch als Fluorophore bezeichnet.

Kennzeichnend für diese Art der Lumineszenz ist, dass das Leuchten unmittelbar bei Beginn der Anregung beginnt und sofort nach Beendigung der Bestrahlung endet. Diese Eigenschaften grenzen die Fluoreszenz klar gegenüber anderen Photolumineszenz-Effekten wie der Phosphoreszenz ab, bei der der Anregungszustand über die Dauer der Anregungszeit hinaus besteht.

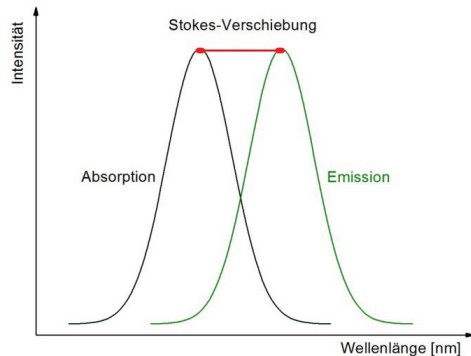


Abbildung 1-1: Die Stokes Verschiebung bezeichnet die Differenz der Wellenlängen zwischen ein- und ausgehenden Photonen bei Lumineszenz-Effekten. Infolgedessen ist das Emissionsspektrum (grün) gegenüber dem Absorptionsspektrum (schwarz) zu höheren Wellenlängen verschoben (rot).

Der polnische Physiker Aleksander Jabłoński stellte 1935 das nach ihm benannte Jablonski-Schema (**Abbildung 1-2**) zur Erläuterung von Energiezuständen bei photochemischen Effekten vor (Jablonski 1935). Die Fluoreszenz setzt sich demnach aus drei grundlegenden Prozessen unterschiedlicher Dauer zusammen:

1. Anregung – Femtosekundenbereich: 10^{-15} s
2. Lebensdauer – Picosekundenbereich: 10^{-12} s
3. Fluoreszenzemission – Nanosekundenbereich: 10^{-9} s

Experimentell kann die Anregung über eine externe Energiequelle mit einer fokussierten Wellenlänge erfolgen; beispielsweise durch einen Laser, der Photonen auf das Fluorophor sendet. Dieses absorbiert die Photonen und wird somit in einen angeregten Singulett-Zustand (S_1 , S_2) überführt. In diesem Zustand finden zahlreiche Interaktionen zwischen dem Fluorophor und dessen molekularer Umgebung statt (z.B. Schwingungsrelaxation). Durch strahlungslose Prozesse wie dem *intersystem crossing* ($T_1 \rightarrow$ Phosphoreszenz) kann die Population des angeregten Zustands ebenfalls reduziert werden. Kehrt das Fluorophor durch Emission des Photons wieder in den S_0 -Grundzustand zurück, wird wegen dieser Energieabnahme die Fluoreszenzemission möglich. Aufgrund der beschriebenen Relaxationsprozesse ist die Energie des emittierten Photons nun aber geringer als bei der Anregung (s. Stokes Verschiebung, **Abbildung 1-1**).

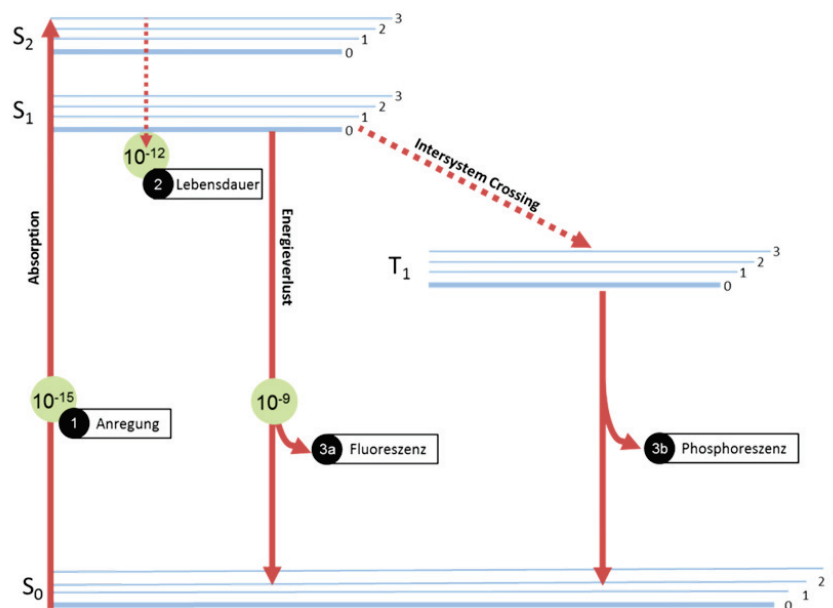


Abbildung 1-2: Jablonski-Termschema für die Illustration der Energiezustände eines Fluorophors. Nach Lichtanregung (1=Anregung) erfolgt die Absorption von Photonen durch das Fluorophor. Dabei werden Elektronen in einen höheren Energiezustand angehoben (S_1 , S_2). Nach energetisch verlustreichen Relaxationsprozessen (2) erfolgt die Rückkehr von S_1 in den Grundzustand (S_0) unter Emission von Licht (3a = Fluoreszenz). Intersystem Crossing bezeichnet einen strahlungslosen Übergang in einen schwingungsangeregten Triplett-Zustand (T_1). Der Rückfall auf S_0 erfolgt im Vergleich zu 3a deutlich langsamer, so dass Phosphoreszenz möglich wird (3b). Strahlungsübergänge sind mit durchgezogenen Pfeillinien dargestellt, strahlungslose mit gestrichelten.

Eine weitere Möglichkeit des strahlungslosen Übergangs eines angeregten Zustands ist die Übertragung der Emissionsenergie auf ein benachbartes Molekül, das diese Wellenlänge als Anregungswellenlänge absorbieren kann. **Abbildung 1-3** zeigt ein hierfür modifiziertes Jablonski-Termschema. Der physikalische Prozess einer solchen strahlungslosen Energieübertragung wird als Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) bezeichnet und wurde erstmals von Theodor Förster beschrieben (Förster 1948).

1.1.1 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)

Findet ein FRET statt, wird die Emissionsenergie des angeregten Farbstoffs (Donor) nicht in Form von Fluoreszenz abgegeben, vielmehr erfolgt die Energieübertragung über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen vom Donor- auf ein Akzeptor-Fluorophor, das dann seinerseits Licht in Form einer spezifischen Wellenlänge emittiert.

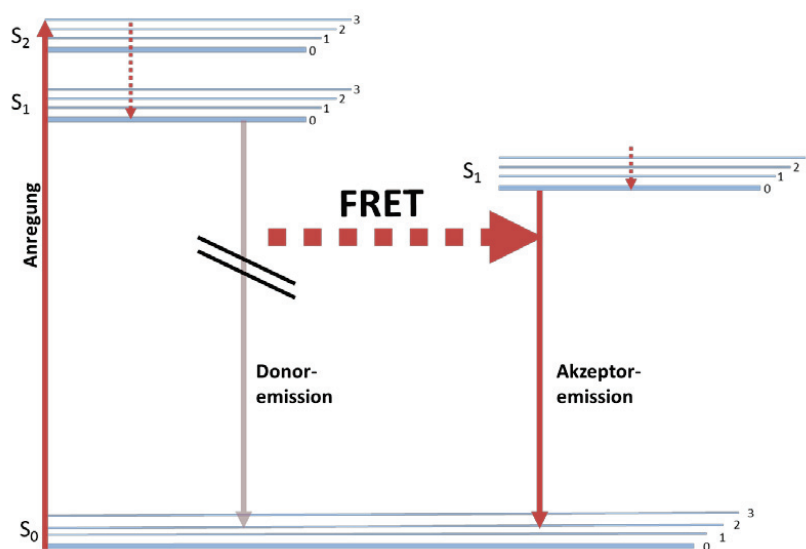


Abbildung 1-3: Jablonski-Termschema für die schematische Darstellung der Energieübergänge bei FRET. Nach Lichtanregung erfolgt die Absorption von Photonen durch das Donor-Fluorophor. Dessen Elektronen werden in einen höheren Energiezustand angehoben (S_1, S_2). Nach energetisch verlustreichen Relaxationsprozessen erfolgt hierbei nicht die Rückkehr von S_1 in den Grundzustand (S_0) unter Emission von Licht (Donoremission). Stattdessen wird strahlungslos Energie auf den Akzeptor übertragen (FRET). Der Abfall von S_1 in den Grundzustand (S_0) erfolgt dann unter Emission von Licht durch den Akzeptor. Strahlungsübergänge sind mit durchgezogenen Pfeillinien dargestellt, strahlungslose mit gestrichelten.

Die Effizienz einer solchen Energieübertragung wird durch verschiedene Einflussgrößen bestimmt. Zum einen durch die räumliche Distanz der beteiligten Moleküle, die weniger als 10 nm betragen sollte (Förster 1948). Gleichermaßen wichtig ist eine ausreichende Überlappung des Donor-Emissions- und des Akzeptor-Absorptionsspektrums (Förster 1959; Patterson, Piston et al. 2000). **Abbildung 1-4** zeigt Beispielspektren für die erforderliche spektrale Überlappung. Darüber hinaus ist die relative Orientierung der Dipole zueinander essenziell für die Effizienz des Übertrags (Förster 1948; Dale, Eisinger et al. 1979).

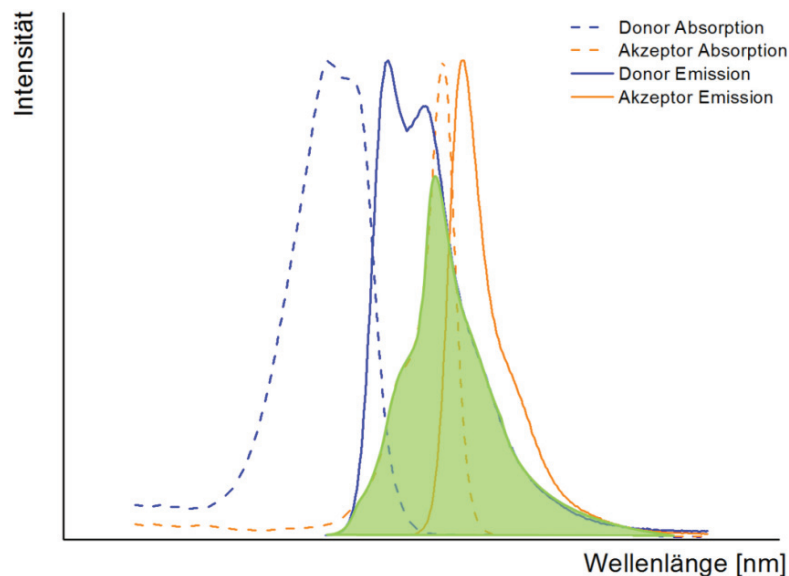


Abbildung 1-4: Beispielspektren für die erforderliche spektrale Überlappung bei FRETs. Die gestrichelten Linien zeigen das jeweilige Absorptionsspektrum der FRET-Partnermoleküle. Die durchgezogenen Linien stehen für die Emissionsspektren. Die spektrale Überlappung des Donor-Emissionsspektrums und des Akzeptor-Anregungsspektrums ist grün hervorgehoben.

1.1.2 Fluoreszenzlebensdauer Messungen

Durch Fluoreszenzlebensdauer Messungen lassen sich molekulare Systeme in ihren grundlegenden Fluoreszenzeigenschaften beschreiben. Wie oben beschrieben, relaxieren die angeregten Moleküle nach der Anregung durch einen Lichtimpuls (Laser), indem sie die Anregungsenergie teilweise in Schwingung, Fluoreszenz und *intersystem crossing* wieder abgeben. Jeder dieser Prozesse erfolgt mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit. Fluoreszenzlebensdauer Messungen ermöglichen die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten dieser Fluoreszenzzerfalls-Prozesse. Die resultierenden Abklingzeiten der Photolumineszenz werden hierbei durch Zeit-korrelierte Einzelphoton-Zählung (time-correlated single photon counting = TCSPC) bestimmt.

Da es sich bei TCSPC um eine zeitaufgelöste Messung handelt und Zeit eine absolute Größe ist, sind die Messungen unabhängig von Parametern wie der Fluorophorkonzentration oder Fluktuationen in des Anregungslichts (O'Connor, Phillips 1984). Fluoreszenzlebensdauer Messungen finden häufig Anwendung bei der Untersuchung von Umwelteinflüssen auf Fluoreszenzproteine, da die Lebensdauer hingegen von Parametern, wie dem pH-Wert oder der Ionenstärke beeinflusst wird (Lakowicz 2006).

1.2 Fluoreszierende Proteine

1.2.1 Das Grün fluoreszierende Protein (GFP) aus *Aequorea victoria*

Die Quallenart *Aequorea victoria* weist an den Rändern ihres glockenförmigen Körpers hell fluoreszierende Punkte auf. Diese Form der Biolumineszenz zog bereits früh das Interesse von Wissenschaftlern auf sich. 1962 isolierte Osamu Shimomura die für dieses Phänomen erforderlichen Komponenten aus dieser pazifischen Quallenart (Shimomura, Johnson et al. 1962). Hierbei handelte es sich um das Photoprotein Aequorin, das nach Bindung von Calciumionen Licht im blauen Wellenlängenbereich emittiert. Begleitend wurde auch das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) aus der Qualle gewonnen.

Über FRET (Kapitel 1.1) überträgt Aequorin in Gegenwart von Calciumionen Energie auf das GFP-Molekül und regt dieses durch die spektrale Überlappung von Aequorin Emissions- und GFP-Anregungsspektrum an (**Abbildung 1-5**). Das Resultat ist eine grüne – anstelle einer blauen Fluoreszenz. GFP wurde erstmals 1994 in *Escherichia coli* und *Caenorhabditis elegans* durch Martin Chalfie exprimiert (Chalfie, Tu et al. 1994). Diese Arbeiten bildeten die Grundlage für die Konstruktion diverser Fusionsproteine mit GFP z.B. zur Visualisierung der Genexpression und Proteinbewegungen in lebenden Zellen. Den dritten zentralen Beitrag der GFP-Grundlagenarbeiten leistete Roger Tsien. Er modifizierte die Sequenz des GFP und erreichte dadurch eine höhere Quantenausbeute (S65T). Ebenso erzeugte er durch Zufallsmutationen des Chromophors blaue (Y66H), gelbe (T203Y) und cyane (Y66W) Farbvarianten. Anschließend gelangen ihm erstmals FRET-Messungen mit diesen GFP-Varianten. Zu seinen Arbeiten zählten zudem die ersten genetisch kodierten FRET-basierten Biosensoren, die für den Nachweis von intrazellulären Calciumionen entwickelt wurden (Miyawaki, Llopis et al. 1997).

Shimomura, Chalfie und Tsien erhielten 2008 den Nobelpreis für Chemie für diese wegweisenden Arbeiten (Chalfie 2009; Shimomura 2009; Tsien 2009).

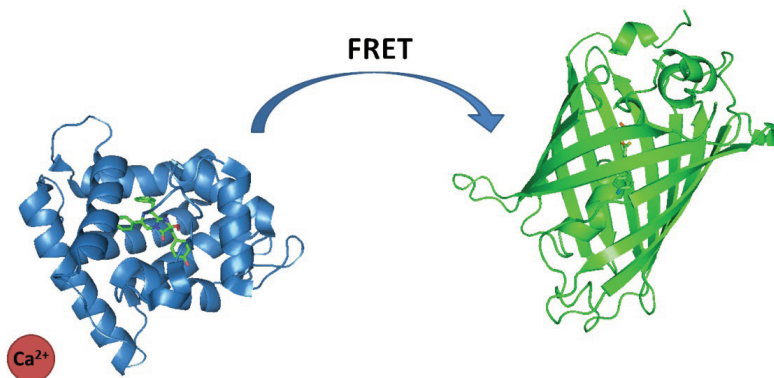


Abbildung 1-5: 3D-Strukturen von Aequorin (blau: 1EJ3) und GFP (grün: 1GFL). Schematisch wird hier ein FRET in Anwesenheit von Ca²⁺ dargestellt.

Das von Osamu Shimomura isolierte Wildtyp-GFP hat eine Kettenlänge von 238 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 26,9 kDa. Seine außergewöhnliche Form wird häufig mit der eines Fasses (*barrel*) oder einer Getränkedose (*can*) beschrieben. Yang und Kollegen veröffentlichten 1996 die Kristallstruktur des Wildtyp-GFPs und bezeichneten es selber als *beta can* (Yang, Moss et al. 1996). **Abbildung 1-6** zeigt die 11 antiparallel angeordneten Beta-Faltblätter, die für diese sehr kompakte Proteinform verantwortlich sind. Das Chromophor ist zentral in dieser Fassstruktur verankert, was es vor Interaktionen mit Makromolekülen schützt. Enzyme können daher beispielsweise nicht die Bildung des Chromophors katalysieren, was die Hypothese der autokatalytischen Chromophorbildung bedingte.

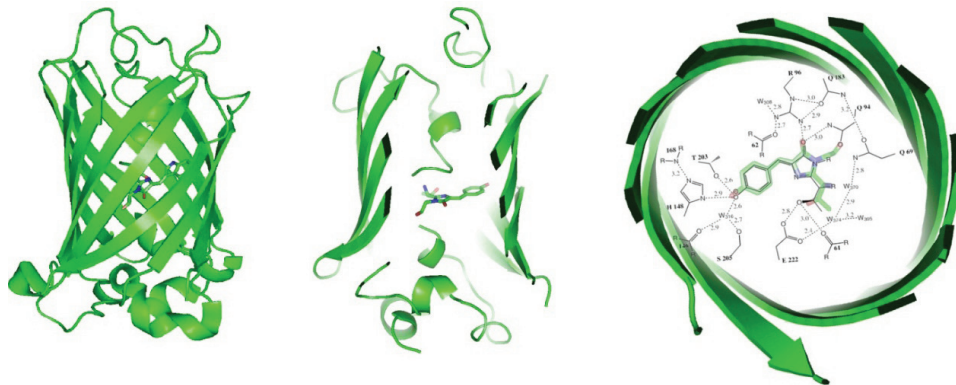


Abbildung 1-6: Fassstruktur des Grün Fluoreszierenden Proteins. Rechts: Darstellung des Chromophors, das aus Aminosäureseitenketten durch Oxidation gebildet wird (Tsien 1998). pdb-code: 1EMA. Dargestellt mit dem Programm PyMol.

Vorschläge für diese autokatalytische Chromophorreifung wurden kontrovers diskutiert, bis sich der in **Abbildung 1-7** dargestellte Mechanismus als wissenschaftlicher Konsens durchgesetzt hatte. Daraus geht hervor, dass die Reifung des Chromophors nicht in Abwesenheit von Sauerstoff vollendet werden kann, da der letzte Oxidationsschritt nicht ohne atmosphärischen Sauerstoff funktionieren kann (Inouye and Tsuji 1994; Heim, Cubitt et al. 1995).

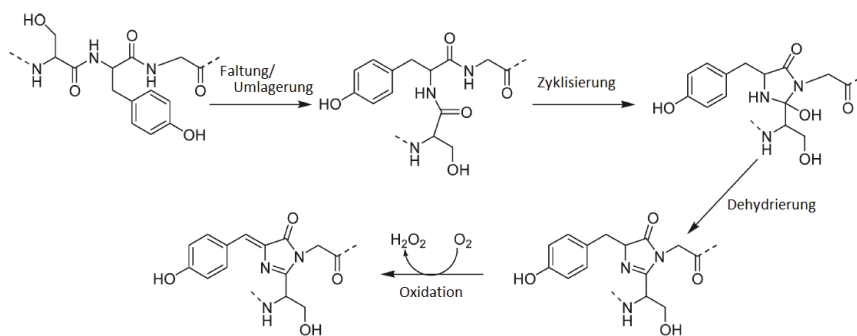


Abbildung 1-7: Vorschlag der autokatalytischen Chromophor-Reifung des GFP (Shimomura 1979; Heim, Prasher et al. 1994; Cubitt, Heim et al. 1995). Bildquelle nach: (Newman, Fosbrink et al. 2011).

Insbesondere die Arbeiten von Roger Tsien ermöglichten die heute so geschätzte Farbvielfalt dieser Proteinfamilie. Seit dem wurde diese kontinuierlich erweitert und Modifikationen bestehender Varianten in Hinblick auf weitere biophysikalischen Eigenschaften, wie der pH-Stabilität, durchgeführt (Zhang, Campbell et al. 2002; Rizzo, Springer et al. 2004). In **Abbildung 1-8** sind verschiedene Farbvarianten des GFP-Chromophors beispielhaft dargestellt.

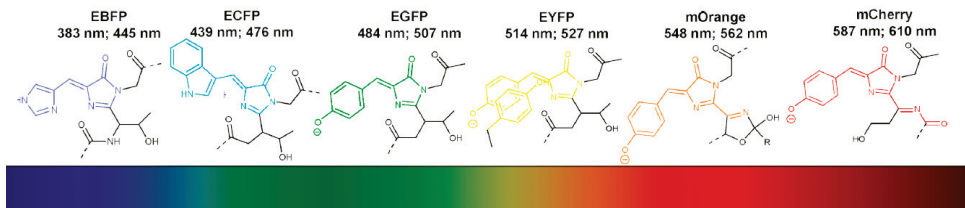


Abbildung 1-8: Einige Chromophor-Varianten als Beispiel für die Farbvielfalt, die durch die Mutation des GFP erreicht werden konnten. Bildquelle nach: (Newman, Fosbrink et al. 2011).

1.2.2 Flavin-mononucleotid-basiertes Fluoreszenzprotein (FbFP)

Ein Nachteil von GFP und seinen Varianten ist die Abhängigkeit der Chromophorreifung von Sauerstoff (vgl. Kapitel 1.2.1). Abgesehen davon sind viele Einflussfaktoren bekannt, die die Fluoreszenzeigenschaften von GFP-Derivaten signifikant beeinflussen (Miyawaki, Llopis et al. 1997; Garrett, Wu et al. 2008; Borst, Willemse et al. 2010). Dies kann insbesondere für die Entwicklung genetisch kodierter Biosensoren problematisch sein, da die Signalantwort für eine quantitative Auswertung robust gegenüber intrazellulären Umweltschwankungen sein sollte.

Ein alternatives Fluoreszenzprotein ist das erst vor einigen Jahren beschriebene Flavin-mononucleotid (FMN)-basierte Fluoreszenzprotein (FbFP) (Drepper, Huber et al. 2010). Diese Blaulichtrezeptoren der LOV (*light-oxygen-voltage*)-Familie sind in Pflanzen und Bakterien weit verbreitet. Ein großer Vorteil dieses Proteins ist die Sauerstoff-unabhängige Reifung (Drepper, Eggert et al. 2007). In **Abbildung 1-9-a** lässt sich gut das als Chromophor fungierende FMN-Molekül im Zentrum des Proteins erkennen. Aufgrund seiner 3-Ring Struktur sind im Anregungsspektrum die für FMN-typischen Absorptionsmaxima zu erkennen (**Abbildung 1-9-b**). FbFP aus *E. coli* (EcFbFP) wird im Rahmen dieser Arbeit als potentielle Alternative zu GFP in verschiedenen Experimenten parallel zu den GFP-Varianten untersucht.

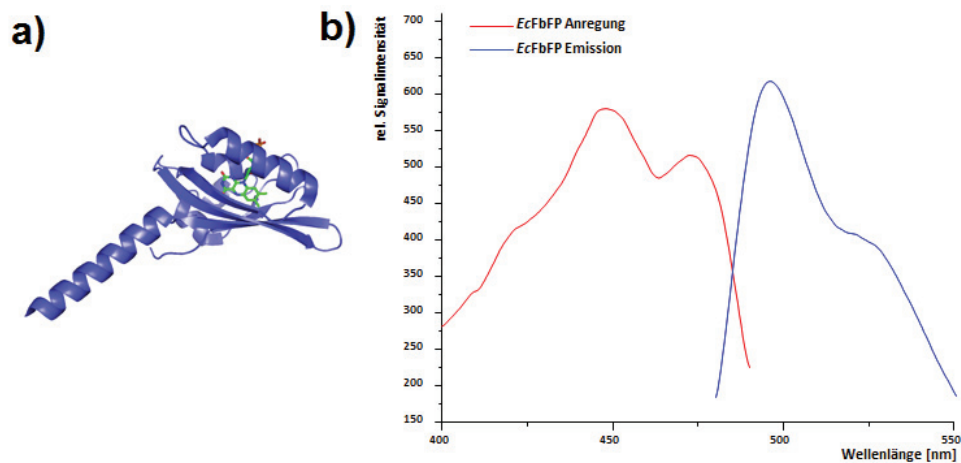


Abbildung 1-9: a) 3D-Struktur des YtvA LOV-Wildtypproteins von *Bacillus subtilis*; hier dargestellt als Monomer (2PR5). Im globulären Teil des Proteins findet sich das FMN-Molekül als Chromophor. b) Anregungs- und Emissionsspektrum von EcFbFP, von dem noch keine Kristallstruktur existiert (Grafik b) nach J. Potzkei, IMET).

1.3 Periplasmatische Bindeproteine

Für die Konstruktion von genetisch kodierten Biosensoren stellt die Auswahl hochselektiver Bindedomänen eine Schlüsselfunktion für die Qualität solcher Messwerkzeuge dar. Die Mechanismen, mit denen Proteine auf molekularer Ebene nicht kovalente Bindungen mit ihren Zielliganden eingehen, ist dabei sehr unterschiedlich. Häufig beruht die Metabolitbindung auf schwachen intermolekularen Wechselwirkungen, wie van-der-Waals-Kräften, elektrostatischen- und hydrophoben Wechselwirkungen, oder der Bildung von Wasserstoffbrücken. Diese Bindungen sind meist hochspezifisch und reversibel (Kahn and Plaxco 2010). Kohlenhydrate sind in einer Vielzahl zentraler physiologischer Zellabläufe involviert. Periplasmatische Bindeproteine (PBPs) des Bakteriums *Escherichia coli* sind für diese Stoffklasse sehr gut charakterisiert.

E. coli ist darauf angewiesen, dass diese Proteine mit einer sehr hohen Affinität ihren spezifischen Liganden binden, damit der Stoffwechsel des Prokaryoten möglichst schnell auf Umwelteinflüsse reagieren kann. Ein weiteres Merkmal bakterieller PBPs ist die oft sehr starke Veränderung der räumlichen Struktur nach Binden des Liganden. Dies wurde durch Kristallstrukturen unter anderem für das Arabinose-Bindeprotein (Quiocho and Vyas 1984; Vermersch, Lemon et al. 1991), das Ribose-Bindeprotein (Bjorkman, Binnie et al. 1994; Bjorkman and Mowbray 1998), das Maltose-Bindeprotein (Sharff, Rodseth et al. 1992; Quiocho, Spurlino et al. 1997) oder auch für das Glucose-Bindeprotein (Borrok, Kiessling et al. 2007) gezeigt. **Tabelle 1-1** zeigt eine Auflistung von PBPs und der entsprechenden Kristallstrukturen in Ab- und Anwesenheit eines Liganden.

In der vorliegenden Arbeit werden zwei PBPs von *E. coli* verwendet; das D-Galactose/D-Glucose-Bindeprotein (GGBP) und das Maltose-Bindeprotein (MBP). Die beiden Bindeproteine stammen aus unterschiedlichen Superfamilien periplasmatischer PBPs. Das GGBP gehört zur Superfamilie der Arabinose-Bindeproteine (ABP); MBP zur Klasse der Histidin-Bindeproteine (HBP). Die beiden Klassen

unterscheiden sich charakteristisch in der Anzahl ihrer β -Faltblätter. ABPs weisen sechs Faltblätter auf; HBP hingegen nur fünf (**Abbildung 1-10**).

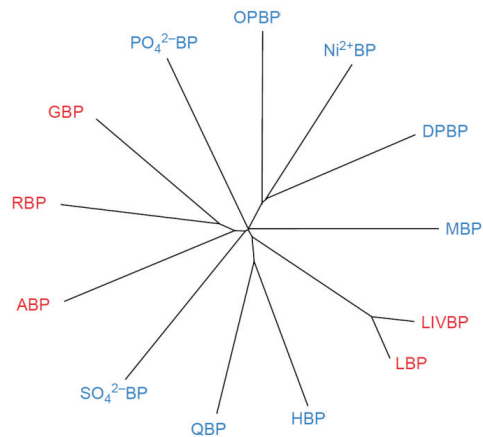


Abbildung 1-10: Phylogenetische Darstellung der Verwandtschaft zwischen den Superfamilien verschiedener periplasmatischer Bindeproteine. Die Farben stehen für die zwei Klassen von Bindeproteinen, die sich charakteristisch in der Anzahl ihrer β -Faltblätter unterscheiden. Das Glucosebindeprotein (hier GBP) gehört zur Superfamilie der Arabinose-Bindeproteine (ABP); Das Maltosebindeprotein (MBP) zur Superfamilie der Histidin-Bindeproteine (HBP). Grafik nach (Dwyer and Hellinga 2004).

Tabelle 1-1: Zusammenfassung der 3D-Strukturen periplasmatischer *E. coli* Bindedomänen. Die Daten sind in der Proteindatenbank der *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* (<http://www.PDB.org>) hinterlegt. **Auszug aus (Dattelbaum 2010).**

Genname der Periplasmatische Domäne	Ligand	PDB ID	
		Offene Form	Geschlossene Form
<i>araF</i>	Arabinose	8ABP	1ABE
<i>mglB</i>	Galactose/Glucose	2FW0	2FVY
<i>rbsB</i>	Ribose	1URP	2DRI
<i>glnH</i>	Glutamine	1GGG	1WDN
<i>maltE</i>	Maltose	1OMP	1ANF
<i>pstS</i>	Phosphate	1OIB	1IXH

1.3.1 D-Galactose/ D-Glucose-Bindeprotein (GGBP)

Das Gen *mglB* kodiert für das D-Galactose/D-Glucose-Bindeprotein (GGBP) in *Escherichia coli*. Das 332 Aminosäuren lange Protein wird über ein Signalpeptid (Pos. 1-23) in das Periplasma des Prokaryoten sekretiert und spielt dort eine wichtige Rolle beim aktiven Transport von Galactose und Glucose, indem es nach der Bindung der entsprechenden Zucker mit speziellen Chemorezeptoren interagiert, die eine Signalkaskade auslösen. Wie in Abschnitt 1.3 erwähnt, vollziehen bakterielle PBPs häufig ausgeprägte Konformationsänderungen bei der Bindung des Zielliganden.

Abbildung 1-11 zeigt das GGBP im ungebundenen Zustand (**a**) und in Anwesenheit von Glucose (**b**). Dabei wird deutlich, wie sich das Protein um das Zuckermolekül legt. Auf molekularer Ebene werden hierbei 13 Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den polaren Seitenketten beider Proteindomänen und den Hydroxylgruppen und Sauerstoffatomen des Zuckers gebildet (McShane and Stein 2009). Als Folge dieser Bindung verschwindet der Zucker fast komplett in der Bindetasche des Proteins; ein Resultat dieser häufig als *pac-man Style* bezeichneten Gelenk-artigen Bewegung des Bindeproteins bei Ligandbindung (Sack, Saper et al. 1989). Die Annäherung der beiden globulären Teildomänen erfolgt mit einer Änderung des relativen Winkels von 31° zueinander (Borrok, Kiessling et al. 2007). Abgesehen von der Zucker-binden Region verfügt GGBP auch über ein Calciumionen-bindendes Motiv (pos. 157 – 165 / 227-228) (Vyas, Vyas et al. 1987).

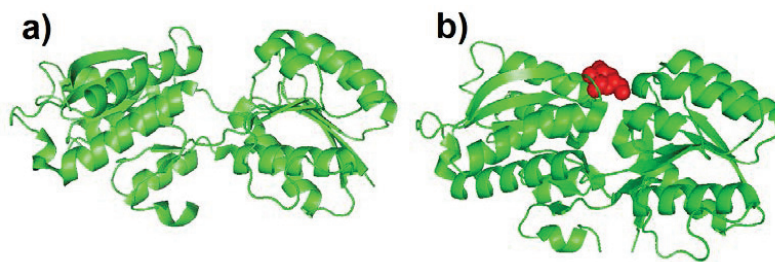


Abbildung 1-11: Quartärstruktur des D-Galactose/D-Glucose-Bindeproteins (GGBP) a) ohne Ligand (PDB: 2FW0) und b) mit D-Glucose (PDB: 2FVY).

1.3.2 Maltose-Bindeprotein (MBP)

Das periplasmatische Maltosebindeprotein (MBP) wird durch das Gen *maltE* kodiert. Beim MBP handelt sich um ein 396 Aminosäuren langes Protein, dass über ein Signalpeptid (Pos. 1-26) in das Periplasma des Prokaryoten sekretiert wird. Analog zum GGBP besteht das MBP aus 2 globulären Domänen, die sich nach Zuckerbindung annähern. **Abbildung 1-12** zeigt die 3D-Struktur des MBPs in mit und ohne Maltose (Spurlino, Lu et al. 1991). Im Fall des MBPs ändert sich der relative Winkel zwischen den globulären Domänen sogar um 35° (Sharff, Rodseth et al. 1992).

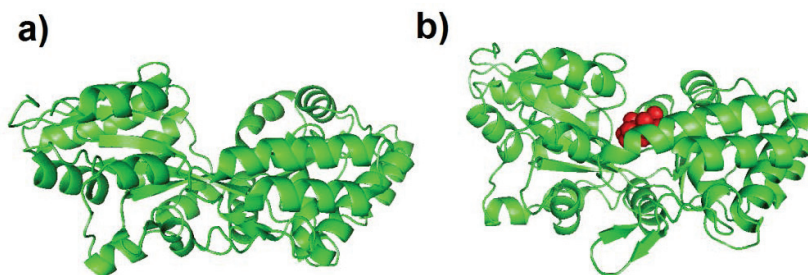


Abbildung 1-12: Quartärstruktur des Maltose-Bindeproteins (MBP) a) ohne Liganden (PDB: 1OMP) und b) mit Maltose (PDB: 1ANF).

1.4 Genetisch kodierte FRET-Biosensoren

Die Idee, über ein Fluoreszenzsignal einen direkten Nachweis für die Präsenz einer Zielsubstanz in Zellen zu erbringen fand ihre ersten Anwendungen bereits vor mehr als 60 Jahren. Damals wurden Antigene des Pneumokokken Erregers in Mausgewebe über immunohistologische Methoden mit Fluoreszenzfärbung nachgewiesen (Coons, Creech et al. 1942). In den folgenden Jahrzehnten gab es zahlreiche Erweiterungen dieser Strategie, jedoch lange mit dem Nachteil, dass das zu untersuchende Gewebe für die Analyse fixiert oder gänzlich zerstört werden musste, so dass die untersuchte Probe immer nur eine Momentaufnahme eines *in vivo* hochdynamischen Fluktuationsprozesses darstellte. Vor allem deswegen haben sich um die Jahrtausendwende genetisch kodierte Fluoreszenzbiosensoren als vielversprechende Visualisierungswerkzeuge etabliert. Denn als *in vivo* co-exprimierte Multikomplex-Proteine bieten sie die Möglichkeit, kontinuierlich Metabolitkonzentrationen nachzuweisen ohne dabei die zu untersuchende Zellen zu zerstören.

Die in dieser Arbeit untersuchten Biosensoren basieren auf dem sogenannten „Venus-Fliegenfallen Modell“ (Felder, Graul et al. 1999) und beruhen auf der Veränderung eines FRET-Signals als Nachweis für die reversible Bindung eines Zielliganden. **Abbildung 1-13** zeigt das Prinzip solcher FRET-basierter Biosensoren. Solche Biosensoren bestehen aus drei Komponenten: An eine periplasmatische Bindedomäne wurden C- und N-terminal Fluoreszenzproteine fusioniert, welche die für FRET notwendige spektrale Überlappung aufweisen (vgl. Kapitel 1, **Abbildung 1-13-a**). Bei den in diesem Projekt verwendeten Sensoren handelt es sich dabei um Varianten des cyan fluoreszierenden GFP-Derivats CFP und Varianten des gelb fluoreszierenden Proteins YFP. Bei Bindung des Liganden, vollzieht das PBP die in Kapitel 1.3 beschriebene räumliche Konformationsänderung, wodurch die Fluoreszenzproteine sich annähern und sich so das FRET-Signal verstärkt. Im Fluoreszenz-Emissionsspektrum der Biosensoren bewirkt die Bindung folgerichtig einen Abfall der Donor-Emission (CFP) bei gleichzeitigem Anstieg des Akzeptorsignals (YFP) (**Abbildung 1-13-b**). Je nach verwendeter Bindedomäne und Fusionsstrategie ist es ebenso möglich Sensoren zu generieren, bei denen sich im Zuge des Bindungsereignisses die FRET-Partner weiter voneinander entfernen.

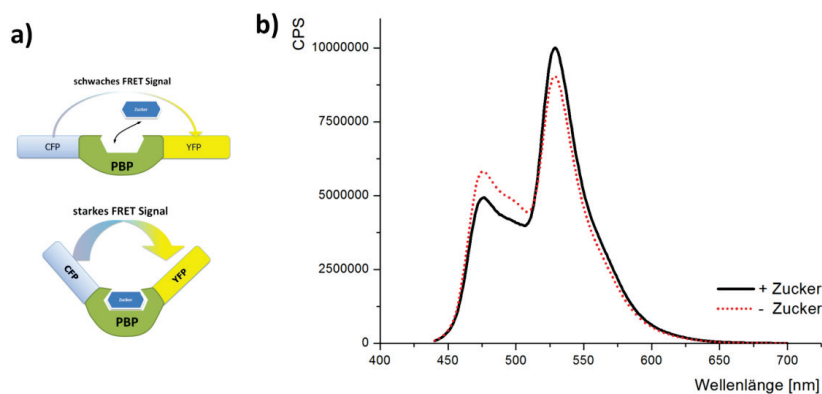


Abbildung 1-13: Schematische Darstellung zur Funktionsweise der verwendeten FRET-basierten Biosensoren. a) Darstellung des „Venus-Fliegenfallen-Modells“: Bei Bindung eines Zuckermoleküls nähern sich die terminal fusionierten Fluoreszenzproteine an, wodurch eine Intensivierung des FRET Signals bewirkt wird. **b)** Änderung des Fluoreszenz-Emissionsspektrums durch Zugabe des entsprechenden Zuckers. Klar zu erkennen ist der Abfall der Donor-Emission bei 485 nm bei gleichzeitigem Anstieg der Akzeptor-Emission bei 528 nm.

Folgerichtig verfügt jedes Biosensor-Konstrukt über eigene Charakteristika, die dessen Funktionalität beeinflussen. Zentral hinsichtlich der Anwendung jeden Sensors ist zunächst seine Affinität gegenüber der nachzuweisenden Substanz und die Intensität der Signaländerung durch die Metabolitbindung. Diese Eigenschaften müssen möglichst präzise definiert sein, um sicherzustellen, dass der Sensor für geplante Messungen geeignet ist.

Hierzu wird *in vitro* eine definierte Menge gereinigten Biosensors mit einer Verdünnungsreihe des Ziel-Liganden gemischt und das Fluoreszenzverhältnis zwischen Akzeptor- und Donoremission (im Folgenden: FRET-ratio) für jeden Konzentrationspunkt bestimmt. Zur Ableitung der Dissoziationskonstante (K_d) aus diesen Messwerten werden diese logarithmisch aufgetragen und mit einer Funktion angepasst (**Formel 5-1**). Der Wendepunkt der resultierenden Kurve bei halbmaximaler Sättigung entspricht dem K_d -Wert. Dieser beschreibt die Affinität des jeweiligen Biosensors bezogen auf die Ligandenkonzentration. Dabei handelt es sich jedoch nicht um einen präzisen Wert, sondern vielmehr um einen Konzentrationsbereich, da die Berechnung dieses Wendepunkts abhängig von der Anzahl der Punkte im Bereich der Steigung und der Qualität der Ausgleichskurve ist. Abweichungen der Messwerte von dieser Standardkurve führen dabei oft zu starken Abweichungen des K_d -Werts.

Abbildung 1-14 zeigt drei verschiedene Glucose-Sensoren im Rahmen einer solchen Untersuchung. Gut zu erkennen ist der jeweils S-förmige Kurvenverlauf. In einem Fall nähern sich die FRET-Partnerproteine bei Ligandbindung an, was in einer Erhöhung der FRET-ratio und einer positiven FRET-Verschiebung resultiert (**Abbildung 1-14-a**). Ebenfalls dargestellt sind zwei Sensorvarianten, die eine negative FRET-Verschiebung aufweisen. Hier entfernen sich YFP und CFP bei Ligandbindung voneinander (**Abbildung 1-14-b**). Aus den jeweiligen Ausgleichskurven lassen sich die K_d -Werte dieser Kurven berechnen. Sie sind durch die vertikalen Linien im Diagramm angedeutet. Demnach haben zwei Sensoren eine Affinität etwa $1 \text{ mM} \pm 0,1 \text{ mM}$ und ein Sensor eine Affinität von $7 \text{ mM} \pm 0,2 \text{ mM}$.

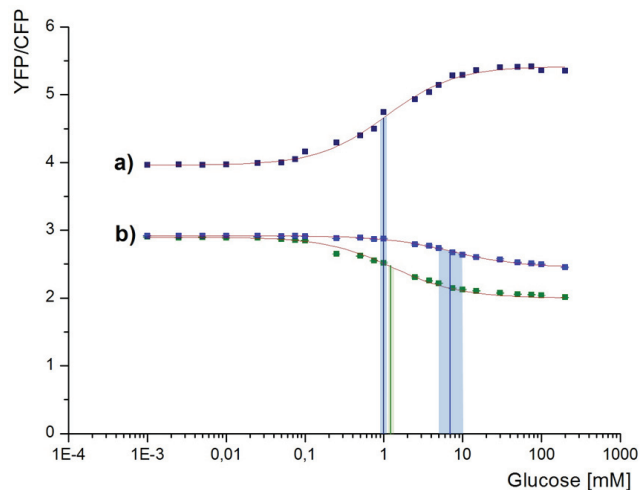


Abbildung 1-14: Glucose-Titrationskurven von drei verschiedenen Glucosensoren. Grüne Quadrate = FLIPglu-mglB(F16A, S112A), blaue Kreise = FLIPglu-mglB(F16A), blaue Quadrate = FLI12Pglu-700 μ Δ6 (Deuschle, Okumoto et al. 2005). Dargestellt durch die vertikalen Linien sind die berechneten Affinitäten (K_d -Werte) der jeweiligen Sensoren. Die Balken, die

diese umgeben kennzeichnen das Fehlerintervall, das aus der Berechnung resultierte, abhängig von der Qualität der Messwerte und der Übereinstimmung der gemessenen Daten mit der Anpassungsfunktion.

Als weiteres wichtiges Charakteristikum ist die Veränderung der FRET-ratio nach Ligandbindung. Sie ist von großer Bedeutung, da sich, gerade in Hinblick auf *in vivo* Messungen, die Signalveränderung vor einem entsprechenden Hintergrundrauschen stark abheben muss. **Abbildung 1-15** illustriert allgemein die wichtigsten Kennzahlen einer solchen Datendarstellung.

Ist die Veränderung nach Metabolitbindung nur schwach, wird es bei Messungen nicht möglich sein, eine konkrete Konzentration von einer gemessenen FRET-ratio abzuleiten, da nicht die Extrempunkte der S-Kurven (**Abbildung 1-15-a,b**) von zentralem Interesse ist, sondern insbesondere der Steigungsbereich um den Wendepunkt (**Abbildung 1-15-d**). Die maximale Änderung des FRET-Verhältnisses (**Abbildung 1-15-c**) sollte somit möglichst groß sein, um eine bessere Auflösung der Konzentrationswerte insbesondere im Steigungsbereich der Ausgleichskurve zu gewährleisten, aus der der K_d -Wert abgeleitet wird (**Abbildung 1-15-d**).

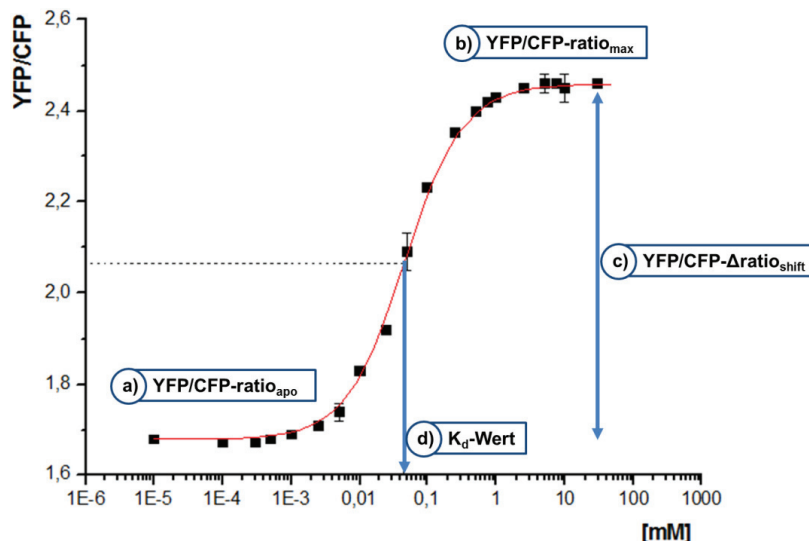


Abbildung 1-15: Beispielhafte Darstellung einer *in vitro* Titrationskurve eines FRET-basierten Biosensors, zur Erklärung der zentralen Begriffe und Kennzahlen. Die Y-Achse zeigt den Quotienten der Fluoreszenzemissionen von Donor (CFP) und Akzeptor (YFP). Die logarithmisch skalierte X-Achse zeigt die Konzentrationspunkte der Verdünnungsreihe des Zielliganden. Bei sehr kleinen Konzentrationen, wird das Ausgangs-FRET-Verhältnis aus YFP/CFP-ratio_{apo} bezeichnet. Die Datenpunkte im Sättigungsbereich der Ligandenkonzentration stellen das maximal erreichbare FRET-Verhältnis dar (YFP/CFP-ratio_{max}). Die Signaländerung zwischen diesen Extrempunkten wird als FRET-Verschiebung (engl. *shift*) bezeichnet (YFP/CFP-ratio_{shift}). Der Bereich der halbmaximalen Sättigung, der mittels einer Ausgleichsfunktion ermittelt wird entspricht der Dissoziationskonstante und beschreibt die Affinität des Sensors (K_d).

Im Fall von **Abbildung 1-14-b** ist die Änderung der blauen Datenreihe sehr gering. Sie beträgt zwischen den Extrempunkten nur 0,4. Viele Datenpunkte teilen sich also einen FRET-ratio Wert, der sich nur um Nachkommastellen unterscheidet. Bei einer *in vivo* Messung mit entsprechendem Signalverlust durch Hintergrundrauschen, würde das eine quantitative Bestimmung unmöglich machen. Bei der grünen Datenreihe beträgt die YFP/CFP-ratio immerhin 0,9. Bei **Abbildung 1-14-a** sind es 1,5. Hier lässt sich mit bloßem Auge jedem Datenpunkt auf der Steigung ein signifikant

anderer YFP/CFP-ratio Wert zuordnen, was eine essentielle Grundlage für die Nutzung solcher Sensoren zur quantitativen Metabolitanalytik *in vivo* darstellt.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei FRET-basierte Biosensoren untersucht, die dem in **Abbildung 1-13** dargestellten Funktionsprinzip entsprechen. **Abbildung 1-16** zeigt den schematischen Aufbau dieser Sensorkonstrukte als Blockdarstellung. Beide tragen als FRET-Donor ein ECFP Protein (blau) und ein gelbes Fluoreszenzprotein als Akzeptor. Beim Glucosesensor ist dies ein Citrine (Griesbeck, Baird et al. 2001), beim Maltosesensor ein EYFP. Diese FRET-Partnermoleküle umschließen jeweils die periplasmatische Bindedomäne, wobei im Fall des Glucosesensors das ECFP in die Bindedomäne integriert wurde (**Abbildung 1-16-a**). Darüber hinaus wurden kurze *linker* –Sequenzen eingefügt, um den FRET-Effekt zu verbessern. Im Vergleich dazu wurden beim Maltosesensor die GFP-Derivate ohne *linker* an das Maltosebindeprotein fusioniert, und zwar so, dass bei den Fluoreszenzproteinen C- bzw. N-terminal 7-8 Aminosäuren deletiert wurden (**Abbildung 1-16-b**).

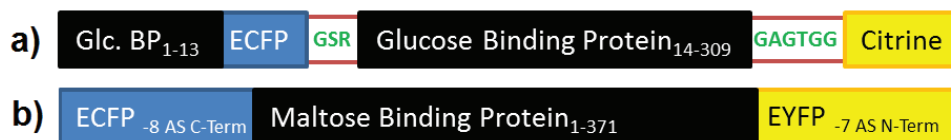


Abbildung 1-16: Schematischer Aufbau der beiden FRET-basierten Biosensoren. a) Der Glucosesensor weist als FRET-Paar ECFP und Citrine, wobei ECFP in die Bindedomäne hineinkloniert wurde und *linker*-Aminosäuren zwischen Bindedomäne und GFP-Derivaten liegen. b) Der Maltosesensor trägt ebenfalls ECFP als Donorprotein und EYFP als FRET-Akzeptor. Diese wurden je terminal an das Maltosebindeprotein fusioniert.

Tabelle 1-2 zeigt einige zentrale Kenndaten dieser Sensorkonstrukte. Darüber hinaus finden sich im Anhang dieser Dissertation (**Abbildung 6-1-Abbildung 6-9**) die kommentierten Nukleotid- und Proteinsequenzen, sowie Emissionsspektren dieser Sensoren und ihrer isolierten FRET-Partnerproteine.

Tabelle 1-2: Kenndaten der im verwendete FRET-basierten Biosensoren.

Bezeichnung	Projektnummer	Ligand	Donor _(ex/em)	Akzeptor _(ex/em)	K _d	Literatur
FLII12Pglu-700μΔ6	MP18.1.1	Glucose	ECFP _(428nm/485nm)	Citrine _(485nm/528nm)	0,9 mM	Deuschle, et al. 2005
FLIPmal25μ	MP24	Maltose	ECFP _(428nm/485nm)	EYFP _(485nm/528nm)	25 μM	Fehr, et al. 2002

1.5 Makromolecular Crowding

Dem Verständnis über die fundamentalen Abläufe jeden Lebens, das von der Einzelzelle aufwärts organisiert ist, liegt das Bestreben zugrunde, ein klares, lückenloses Bild von den Abläufen im Zellinneren zu erhalten. Dass bis heute kein vollständiges Modell Zell-interner Abläufe existiert, lässt sich damit erklären, dass es keine experimentelle Methode gibt, die die unzähligen Informationen liefern würde, die nötig wären, um einen solchen Entwurf zu konstruieren (Goodsell 1991). Historisch bedingt basiert das Verständnis von Strukturb biologien auf einem *divide and conquer*-Prinzip. Einzelne Proteine lassen sich mit diversen Werkzeugen der Biochemie, wie z. B. Kernresonanzspektroskopie (NMR) oder Röntgenkristallstrukturen sehr detailreich studieren. Obwohl diese Techniken zu enormen Fortschritten im Verständnis der untersuchten Details beitrugen und aus diesen

Experimenten z.B. informative Datenbanken mit Proteinstrukturen resultierten, ging hierbei die Information über den Einfluss des zellulären Kontexts verloren. Denn die analysierten Proteine mussten für all diese Strukturuntersuchungen isoliert, also aus ihrem natürlichen Kontext genommen, werden. Zudem erwies es sich als nicht trivial *in vitro*-erhaltene Proteinstrukturen bzw. Proteineigenschaften (Stabilität, Aktivität) auf biologische Prozesse zu übertragen (Burz and Shekhtman 2009).

Seit mehreren Jahrzehnten arbeiten Wissenschaftler daran, das Cytosol verschiedener Organismen quantitativ zu beschreiben, um Rückschlüsse auf die Regulation komplexer Stoffwechselwege in der Zelle zu ziehen. Im Zuge dieser Experimente stellte sich schnell heraus, dass das Zellinnere weniger den stark verdünnten Reaktionsbedingungen typischer *in vitro* Bedingungen ähnelt, als vielmehr durch diverse Makromoleküle dicht angefüllt ist. Dies kann nicht nur basierend auf mathematischen Berechnungen angenommen werden, sondern auch aufgrund von *in vivo* Untersuchungen, bei denen intakte Zellen eingefroren und mittels Kryo-Elektronentomografie untersucht wurden (Medalia, Weber et al. 2002). Der Zellaufbau kann dabei ohne chemische Vorbehandlung, Anfärben oder Dünnschnitte direkt betrachtet werden. **Abbildung 1-17** zeigt das hoch organisierte und gedrängte Zellinnere; ein Zustand, den man mit dem Begriff (*macro-*) *molecular crowding* beschreibt.

Diese dicht gedrängte Umgebung beeinflusst die thermodynamischen Parameter von funktionalen Proteinen; also sowohl ihre Stabilität als auch die Dynamik (Minton 1983). Selbst wenn man davon ausginge, dass keine direkte Interaktion zwischen Proteinen und der umgebenden Flüssigkeit stattfindet, so beeinflusst allein der limitierte Aktionsraum um die Proteine deren Stabilität und Reaktionen (Ellis and Minton 2003; Hall and Minton 2003).

Diese Bewegungseinschränkung führt zu sogenannten *Volumenausschlusseffekten*. Ebenso kann es zu *Einschlusseffekten* durch undurchdringbare Barrieren kommen (Ping, Yuan et al. 2004). *Molecular crowding* könnte daher einen starken Effekt auf Reaktionsgeschwindigkeiten, an denen Makromoleküle beteiligt sind, haben (Ralston 1990; Zimmerman and Minton 1993; Grunewald, Medalia et al. 2003; Hall and Minton 2004).

Diese Effekte gelten für alle Makromolekülen in allen Zelltypen: sie sollten daher bei der Untersuchung z.B. von Proteineigenschaften experimentell berücksichtigt werden (Ellis 2001; Minton 2001).

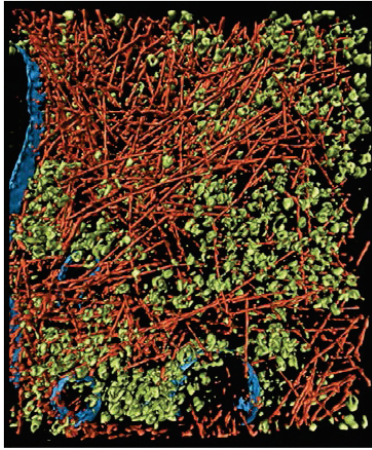


Abbildung 1-17: Das gedrängte Zellinnere. Eine 3D-Rekonstruktion durch *Kryo*-Elektronentomografie zeigt einen Teil des Cytoplasmas einer *Dictyostelium discoideum*-Zelle. Die orangen länglichen Komplexe sind Aktin Filamente. Makromolekulare Proteine sind grün dargestellt; Membranen blau (Medalia, Weber et al. 2002).

Im vorliegenden Promotionsprojekt wird das Bakterium *Escherichia coli* untersucht. Die Proteinkonzentration im Cytosol von *E. coli* wird mit $300\text{--}400\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ angegeben (Zimmerman and Trach 1991). In diesem Zusammenhang muss man sich vergegenwärtigen, dass *in vitro* Experimente meist unter stark verdünnten Konzentrationen von $< 10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ durchgeführt werden, bei denen der *crowding* Effekt vernachlässigt werden kann. Um biochemische Prozesse von lebenden Zellen zu untersuchen, sollten die *crowding*-Bedingungen daher auch durch *in vitro* Experimente simuliert werden (Chebotareva, Kurganov et al. 2004). Dies wird durch die Zugabe von so genannten *crowding agents* (auch: *crowder*) versucht, die die Viskosität erhöhen und so die gedrängte Situation im Cytosols simulieren sollen. *Crowder* sind hochmolekulare Verbindungen wie Polyethylenglycol (PEG), Dextran, Ficoll, Hämoglobin oder auch Rinderserumalbumin (BSA). Bei PEG und Dextran handelt es sich um langkettige Moleküle, wohingegen Hämoglobin und BSA globuläre *crowder* sind (vgl. **Abbildung 1-18**). Ficoll ist ein verzweigtes Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer und bildet eine Art Übergang zwischen den *crowder*-Familien.

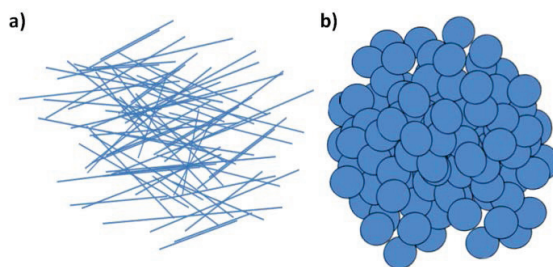


Abbildung 1-18: Schematische Darstellung zweier Typen künstlicher *crowding agents*: a) langkettige Moleküle, wie z.B. Polyethylenglycol (PEG), Ficoll oder Dextran. b) Globuläre Moleküle, wie Hämoglobin oder Rinderserumalbumin (BSA).

Wie auch in der lebenden Zelle bewirkt der Volumenausschlusseffekt bei diesen künstlichen *crowdern*, dass in einer Lösung, die zu 30 vol% aus identischen Makromolekülen besteht, lediglich

etwa nur 1 % des Restvolumens für ein weiteres Molekül derselben Größe zugänglich ist (**Abbildung 1-19**). Folglich finden biochemische Reaktionen unter dicht gedrängten Bedingungen statt und sind evolutiv darauf angepasst. Die resultierenden Folgen auf Reaktionen, bei denen beispielsweise die Diffusionsgeschwindigkeit limitierend ist, sind offensichtlich und sollten bei *in vitro* Experimenten Berücksichtigung finden. Jedoch werden diese Untersuchungen im Laboralltag vornehmlich mit stark verdünnten Lösungen durchgeführt, was keinesfalls den Reaktionsbedingungen in lebendigen Zellen entspricht.

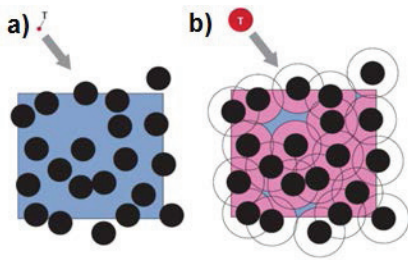


Abbildung 1-19: Illustration des Volumenausschlusseffekts. Dargestellt ist ein Bereich, der zu 30 % von Makromolekülen der gleichen Größe eingenommen wird (schwarze Kreise). **a)** Ein sehr kleines Molekül (T) hat Zugang zu bis zu 70 % des verbleibenden Raumes (blauer Bereich). **b)** Ein Molekül der gleichen Größe hingegen ist ausgeschlossen vom Großteil der verfügbaren 70 %, da es sich den anderen Makromolekülen aufgrund physikochemischer Kräfte nur begrenzt nähern kann (Kreisbereiche um die Makromoleküle) (Grafik nach Ellis, 2001).

Die Analyse biochemischer Prozesse unter realistischeren Bedingungen ist folglich ausgesprochen wichtig, da diese Bedingungen eine ubiquitäre Eigenschaft aller Zellen sind und der *crowding*-Zustand ein essenzieller Parameter für die effiziente Funktionsweise des Metabolismus sein dürfte. Denn als Konsequenz des beschriebenen Effekts von *molecular crowding* erhöht dieses die lokale Konzentration einer makromolekularen Proteinspezies und steigert somit ihre chemische Aktivität, da die Dissoziationskonstanten verändert werden, um beispielsweise Proteinkomplexe zu formen (Zhou, Rivas et al. 2008). Hierfür gibt es bereits eine Vielzahl an dokumentierten Beispielen. Die Steigerung der molekularen Interaktionen zwischen Proteinen und DNA durch *crowding* hat großen Einfluss auf Prozesse wie Transkription und DNA-Replikation (Zimmerman and Minton 1993). Von besonderem Interesse ist *crowding* zudem bei der Proteinfaltung (van den Berg, Ellis et al. 1999), unter anderem durch eine verstärkte Effektivität von Chaperonen (Hartl 1996).

Wie gravierend die Unterschiede zwischen diesen experimentellen Bedingungen sein können, wird am Beispiel der V8-Protease von *Staphylococcus aureus* deutlich. *In vitro* katalysiert dieses Enzym durch die Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts die Umkehrreaktion zu dessen *in vivo* Funktion, da die dicht gedrängte Reaktionsumgebung fehlt (Kumaran, Datta et al. 2000).

Die in diesem Promotionsprojekt untersuchten Biosensoren wurden daher ebenfalls unter künstlich gedrängten Bedingungen getestet, um einen möglichen Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften und die Bindeaffinität durch die Bedingungen *in vivo* und *in vitro* abschätzen zu können.

2 Zielsetzung

Ein immer tieferes Verständnis über die konkreten Stoffwechselabläufe innerhalb von lebenden Zellen stellt Organismen-übergreifend große Herausforderungen an die moderne Wissenschaft. Mithilfe neuer Informationen auf diesem Gebiet wird die Grundlage dafür geschaffen, beispielsweise bakterielle und eukaryotische Stämme genetisch zielgerichtet für die Produktion von Feinchemikalien zu optimieren, oder auch auf dem Feld der pharmazeutischen und medizinischen Forschung Kenntnisse über zentrale Stoffwechselwege für die Herstellung neuer Therapien zu erlangen.

Dabei ist es von besonderem Interesse, nicht-invasive Nachweismethoden zu entwickeln, durch die es möglich ist, kontinuierlich in Echtzeit die Präsenz von Schlüsselmetaboliten spezifisch und lokal aufgelöst in lebenden Zellen nachzuweisen. In den letzten zehn Jahren wurden Fluoreszenz-basierte Biosensoren als vielversprechende Werkzeuge für diese Aufgabe entwickelt.

Ziel dieser Arbeit war die umfassende exemplarische Charakterisierung und Evaluierung häufig genutzter genetisch kodierter Fluoreszenzbiosensoren vom „Venus-Fliegenfallen“-Typ, die aus einer zentralen Zucker-bindenden Domäne bestehen und am C- und N-Terminus ein Fluoreszenzprotein als Reporter tragen. Sie dienen dem Nachweis von Glucose bzw. Maltose. Diese Sensoren reagieren in Abhängigkeit von der Metabolitkonzentration mit einem veränderten Förster-Resonanz Energietransfer-Signal (FRET) zwischen den beiden Fluoreszenzproteinen. Die Sensoren sind weit verbreitet und werden Organismen-übergreifend zur *in vivo* Quantifizierung verschiedener Zucker eingesetzt (Bermejo, Haerizadeh et al. 2011; Hou, Takanaga et al. 2011).

In der vorliegenden Promotion sollte daher erstmals systematisch untersucht werden, wie solche FRET-Sensoren auf Umgebungsänderungen reagieren und in wie weit man von *in vitro* Kalibrationskurven tatsächlich auf intrazelluläre Metabolit-Konzentrationen schließen kann. Dazu sollten die Umgebungsbedingungen schrittweise vom *in vitro*-System in Puffer an zellähnliche Verhältnisse angenähert werden, bei denen die meisten Parameter weder kontrollierbar, noch gerichtet modifizierbar sind.

Die Vorgehensweise ist in **Abbildung 2-1** gezeigt. Beginnend mit umfassenden Untersuchungen in Puffer, sollten anschließend Untersuchungen mit künstlichen *crowdern* und im Rohextrakt folgen. Je näher man der *in vivo* Ebene kommt, desto komplexer und unkontrollierter ist die Zusammensetzung des Systems.

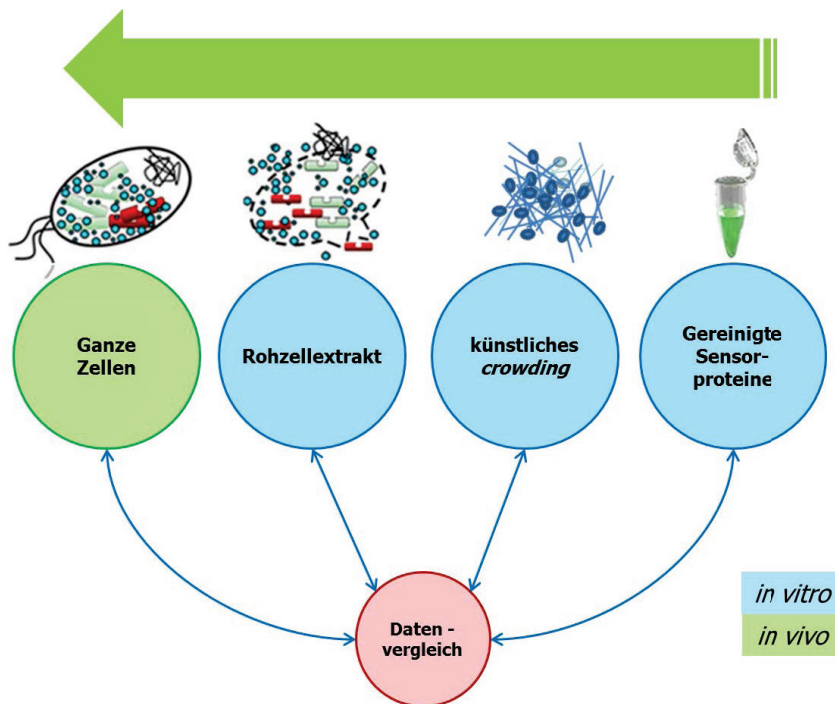


Abbildung 2-1: Allgemeines Schema zur Charakterisierung der Biosensoren in dieser Arbeit. Gezeigt sind die verschiedenen Untersuchungsebenen (grüne/ blaue Kreise) mit dem Ziel des abschließenden Datenvergleichs (roter Kreis). Der grüne Pfeil zeigt die wachsende Komplexität des Messsystems.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung der gereinigten Sensorproteine

3.1.1 Kultivierung Biosensoren

Kompetente Bakterienzellen wurden mit dem Plasmid FLII12Pglu-700 μ Δ 6 bzw. FLIPmal25 μ transformiert (Kapitel 5.4). Bei FLII12Pglu-700 μ Δ 6 handelt es sich um einen genetisch kodierten Biosensor für Glucose (Deuschle, Okumoto et al. 2005). FLIPmal25 μ dagegen wurde für den Nachweis des Disaccharids Maltose konstruiert (Fehr, Frommer et al. 2002). Da beide Biosensoren GFP-basierte Fluoreszenzproteine aufweisen, muss bei der Kultivierung für einen ausreichenden Sauerstoffeintrag gesorgt werden, um die autokatalytische Reifung der Chromophormoleküle zu ermöglichen (Inouye and Tsuji 1994; Heim, Cubitt et al. 1995).

Die Reifung der Biosensoren wurde begleitend zur Kultivierung verfolgt, indem 2 mL-Proben pelletiert und in klarem Puffer (MOPS, Tris-HCl, Wasser) resuspendiert wurden. Anschließend wurde die Fluoreszenzemission der Suspension nach Anregen bei 428 nm als Spektrum aufgezeichnet, um die Ausprägung der Emissionsmaxima der GFP-Farbvarianten CFP und YFP zu überprüfen (Baierl 2011). Abbildung 3-1 zeigt zwei Fluoreszenz-Emissionsspektren für die Kultivierung des Glucosesensors, und zwar nach 24 und 48 Stunden. Deutlich zu erkennen ist hierbei, dass die charakteristischen Emissionsmaxima des Donor- und Akzeptorproteins erst nach 48 h klar über dem Hintergrundrauschen erkennbar sind. Da es nicht im Fokus der vorliegenden Arbeit lag, die Kultivierung zu optimieren und eine Kultivierungsdauer von 2 Tagen unproblematisch für die experimentelle Planung war, wurde die Inkubationszeit auf 48 h ohne Induktion mit IPTG als Standard festgelegt.

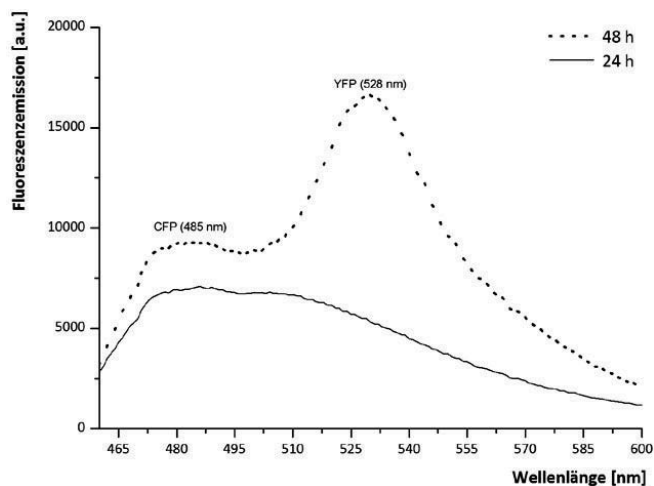


Abbildung 3-1: Emissionsspektren der Kultivierungsbrühe als Indikator für den Reifungszustand der GFP-Derivate CFP und YFP im Glucosesensor. Erst nach 48 Stunden sind die charakteristischen Emissionsmaxima von CFP (485 nm) und YFP (528 nm) zu erkennen.

Nach Beendigung der Kultivierung wurden die Zellen pelletiert mittels Ultraschall aufgeschlossen. Im Anschluss an den Zellaufschluss und das Abtrennen der Zelltrümmer vom Rohzellextrakt durch Zentrifugation wurden die Sensoren mittels immobilisierter Metallionen Affinitätschromatografie (IMAC) gereinigt.

Die Kultivierung der isolierten Fluoreszenzproteine erfolgte analog mit nur leichten Modifikationen (vgl. Abschnitt 5.5).

Abbildung 3-2 zeigt eine affinitätschromatografische Aufreinigung der Zielproteine am Beispiel von ECFP. Zunächst wurde der gefilterte Rohzellextrakt auf die Säule gegeben (**Abbildung 3-2-a**) und anschließend das Zielprotein eluiert (**Abbildung 3-2-b**).

Die Ausbeute einer Kultivierung lag beim Glucosesensor bei $2,5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ eingesetzter Biofeuchtmasse (BFM) und für den Maltosesensor bei $5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{BFM}}$ (Baierl 2011). Bei den isolierten Fluoreszenzproteinen konnten aufgrund des Autoinduktionsmediums (vgl. 5.5) höhere Ausbeuten von 9 bis $16 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{BFM}}$ erreicht werden.

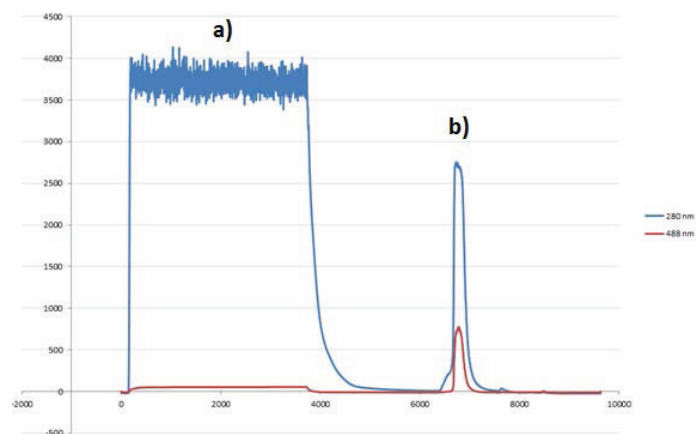


Abbildung 3-2: Chromatogramm einer affinitätschromatographischen Reinigung des Donorproteins ECFP. Die blaue Linie entspricht dem Absorptionssignal für die Gesamtheit aller eluierten Proteine bei 280 nm; die rote Linie dem Signal bei 488 nm. Im vorliegenden Fall handelt es sich um eine Reinigung des Donorproteins ECFP, was in Wellenlängenbereich von 488 nm nur eine geringe Absorption aufweist, was das Verhältnis des roten und blauen Elutionspeaks erklärt.

3.2 Charakterisierung der Biosensoren und Fluoreszenzproteine

FRET-basierte Biosensoren werden bislang vor allen Dingen im Feld der Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Dabei handelt es sich meist um Untersuchungen von ganzen Zellverbänden, in denen der Biosensor exprimiert wurde. Der experimentelle Ablauf erfolgt wie in **Abbildung 3-3** gezeigt.

Über eine spezifische Anregungswellenlänge wird der Donor des Sensors angeregt und dessen Emissionssignal ebenso ausgelesen, wie das des Akzeptors. Der resultierende YFP/CFP-Quotient wird dann mittels einer zuvor gemessenen *in vitro*-Titrationskurve einer Ligandkonzentration zugeordnet. Darauf basierend wird dann eine intrazelluläre Ligandkonzentration bestimmt. Diese Korrelation von Fluoreszenzverhältnissen *in vivo* mit *in vitro* Kalibrationen setzt voraus, dass sich in dem komplexen *in vivo* System relativ zur Kalibration in willkürlich gewählten Puffer keine Einflussfaktoren auf die Signalintensität der Sensoren und auf das Bindeverhalten der zentralen Bindedomäne ergeben.

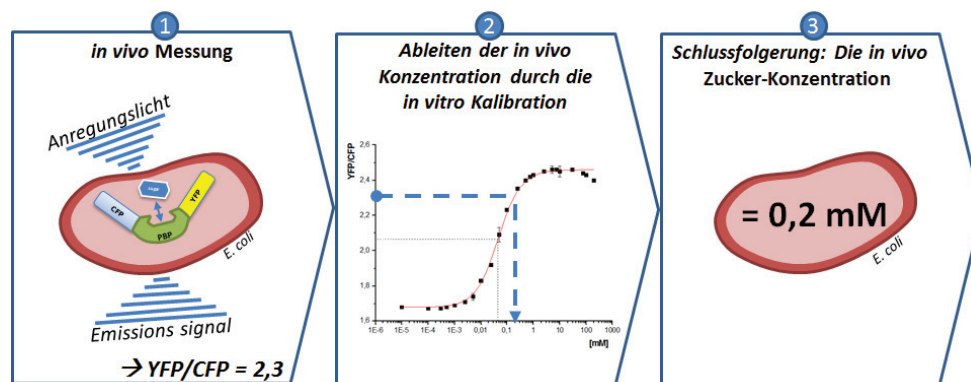


Abbildung 3-3: Schema des experimentellen Ablaufs einer *in vivo* Anwendung von FRET-basierter Biosensoren. Schritt 1 illustriert eine *in vivo* Messung bei einer Zelle, in der FRET-basierte Biosensoren exprimiert werden. Nach Anregung des Donor-Fluorophors wird der Quotient aus den Emissionsintensitäten der beiden GFP-Derivate gebildet (YFP/CFP). Anschließend wird mit Hilfe einer *in vitro* Titrationskurve das YFP/CFP-Signal einer Ligandkonzentration zugeordnet (Schritt 2). Dieser Wert wird dann als *in vivo*-Konzentration angenommen (Schritt 3).

3.2.1 Einfluss des pH-Werts auf das Sensorsignal

Die Abhängigkeit des FRET-Signals gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen, wie dem pH-Wert, der Ionenstärke des Analysepuffers oder der Reaktionstemperatur wurden im Rahmen dieser Arbeit geplant und in einer parallel laufenden Bachelorarbeit untersucht (Baierl 2011).

Hierbei konnten überraschend starke Einflüsse beider Parameter auf das Messsignal nachgewiesen werden, wie sich beispielhaft aus **Abbildung 3-4** entnehmen lässt, die das pH-Screening mit beiden Sensoren zeigt.

Festzustellen war jedoch in beiden Fällen eine starke Abweichung der Resultate was, wenn man **Abbildung 3-3** berücksichtigt, ausgesprochen problematisch für eine *in vivo* Anwendung sein kann. Vor allem, weil man den intrazellulären pH-Wert einer *in vivo*-Messung nicht zwingend kennt. Sowohl das Ausgangs-FRET-Verhältnis, als auch die Werte im Sättigungsbereich verlaufen stark unterschiedlich. Die resultierenden K_d -Werte dieser andersartigen Kurven schwanken enorm. Für

den Glucosensor zwischen 0,2 - 4,7 mM (**Abbildung 3-4-a**) und für den Maltosensor zwischen 7 - 54 μ M (**Abbildung 3-4-b**).

Da die untersuchten Biosensoren jedoch aus drei Domänen (CFP:PBP:YFP) bestehen, war zunächst unklar, welche der Domänen für die beobachteten Effekte verantwortlich war.

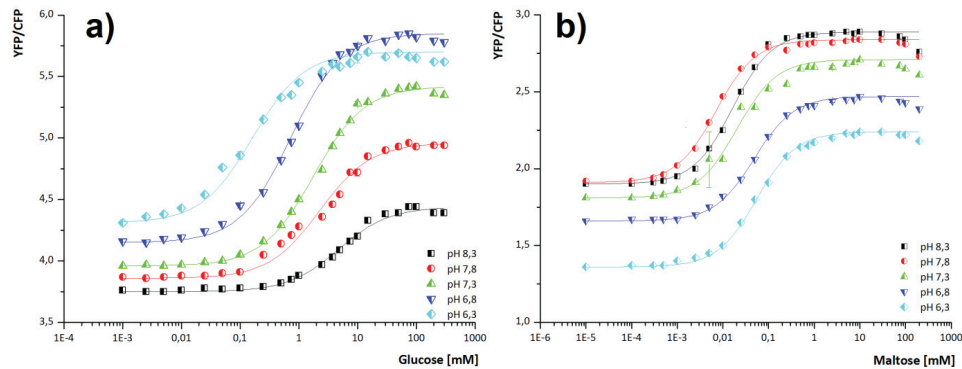


Abbildung 3-4: Titrationskurven a) des Glucosensors und b) des Maltosensors bei unterschiedlichen pH-Werten. Alle Messungen wurden mit $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Sensorprotein in 20 mM MOPS bei 25 °C durchgeführt (Baierl 2011). Die Messungen wurde in jeweils in drei unabhängigen Experimenten wiederholt.

Um der molekularen Ursache der Effekte zu klären, wurden die Fluoreszenzproteine der Sensoren (ECFP, EYFP, Citrine) isoliert und unter analogen Bedingungen untersucht. **Abbildung 3-5** und **Abbildung 3-6** zeigen den Einfluss des pH-Werts auf die Fluoreszenzemission der GFP-Derivate. Die Effekte sind hierbei nicht einheitlich. Bei dem Donorprotein ECFP, welches beide Sensoren enthalten, führt eine Erhöhung des pH-Werts auch zu einer höheren Fluoreszenzemission (**Abbildung 3-5**). Für beide Akzeptorproteine hingegen ist der Effekt etwas weniger dramatisch, jedoch gegenteilig: Je höher der pH-Wert, desto niedriger die Intensität der Fluoreszenzemission.

Dieses asynchrone Verhalten von Donor- und Akzeptorprotein-Emission wirkt sich folglich auf die Quotientenbildung zur Bestimmung der YFP/CFP-ratio stark aus und erklärt zumindest im Falle des Glucosensors ansatzweise die in **Abbildung 3-4-a**) dargestellten Kurvenverläufe. Die beim Maltosensor (**Abbildung 3-4-b**) zu erkennende inverse Abhängigkeit der YFP/CFP-ratio vom pH-Wert kann jedoch dadurch nicht erklärt werden. Insgesamt besteht wahrscheinlich auch ein Einfluss auf die Proteinbindedomänen, der nicht direkt nachgewiesen werden kann.

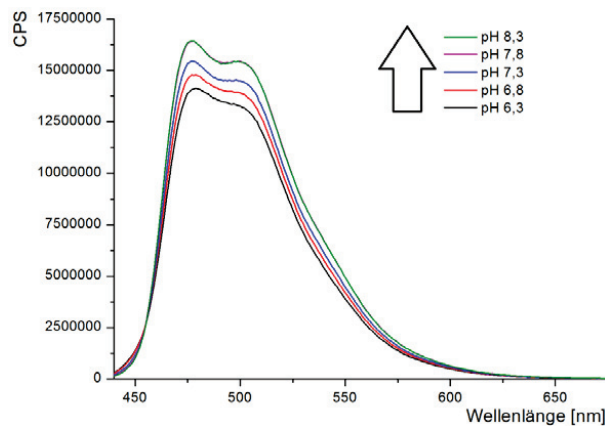


Abbildung 3-5: Fluoreszenzemissionsspektren des Donorproteins ECFP bei verschiedenen pH-Werten in 20 mM MOPS Puffer bei 25 °C. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Jede Messung wurde dreimal wiederholt.

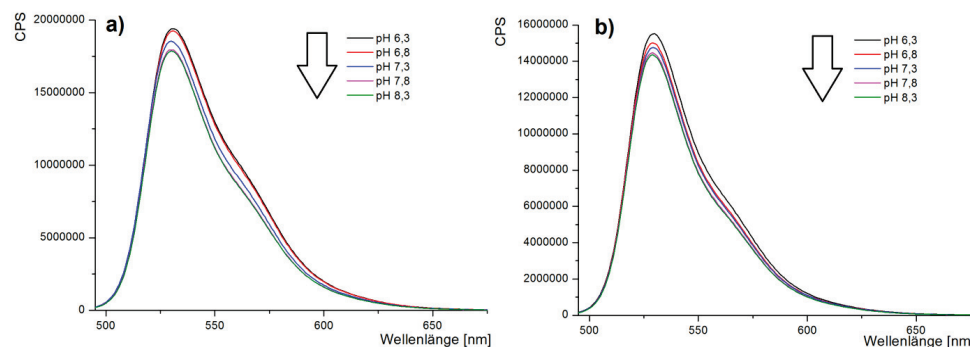


Abbildung 3-6: Fluoreszenzemissionsspektren der Akzeptorproteine a) Citrine und b) EYFP bei verschiedenen pH-Werten in 20 mM MOPS Puffers bei 25 °C. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug jeweils $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Jede Messung wurde dreimal wiederholt.

Da auch in verschiedenen anderen Experimenten dieses interessante umgekehrte Verhältnis beobachtet werden konnte (vgl. Abschnitt 3.2.3), lässt sich die Vermutung äußern, dass zum einen die unterschiedliche Art der Integration bei den Donorproteinen in das Sensorkonstrukt eine Ursache für dieses Phänomen sein könnte. Abgesehen von diesem Unterschied in der Konstruktion, weisen die beiden Sensoren zudem unterschiedliche Bindeproteine auf, die durchaus unterschiedlich auf pH-Schwankungen reagieren können. Die Folge könnte eine Konformationsänderung sein, die die Orientierung der FRET-Partner zueinander verändert oder deren Distanz variiert.

Fazit: Die dargestellten Untersuchungen zeigen die Bedeutung des pH-Werts für die Fluoreszenz- und Bindeeigenschaften der untersuchten Biosensoren. Es sollte betont werden, dass bereits die Variation des pH-Wertes im physiologischen Bereich (pH 6,3-8,3) zu signifikanten Unterschieden des Fluoreszenzsignals führt, die sich nur teilweise durch die Beeinflussung des Donors ECFP erklären lassen. In allen Fällen führen die unterschiedlichen pH-Werte zu scheinbar verschiedenen Dissoziationskonstanten und folglich zur Zuordnung verschiedener Metabolitkonzentrationen, wenn

auf der Basis solcher Kalibrationskurven *in vivo*-Daten ausgewertet werden (vgl. **Abbildung 3-3**). Darüber hinaus ist festzuhalten, dass es diese Sensoren auch zur *in vivo* Konzentrationsbestimmung in eukaryotischen und pflanzlichen Zellen eingesetzt werden, die aufgrund der Organellen keinen homogenen pH im Zellinneren aufweisen. Mögliche Fehlerquellen bei quantitativen Messungen sind hier offensichtlich.

3.2.2 Einfluss der Ionenstärke auf das Sensorsignal

Darüber hinaus wurde der bereits in der Bachelorarbeit von Anna Baierl (Baierl 2011) beobachtete Einfluss der Ionenstärke durch Erhöhung der Konzentration des MOPS-Puffers (**Abbildung 3-6**) auf die charakteristischen Sensorparameter weiter untersucht. In den vorangegangenen Untersuchungen (**Abbildung 3-7**) zeigten, dass es keinen klaren Trend zwischen zunehmender Ionenstärke und der FRET-Signalveränderung gibt. Auffallend war jedoch, dass je nach Pufferkonzentration bei beiden Sensoren eine starke Veränderung des YFP/CFP Signalverlaufs zu beobachten war.

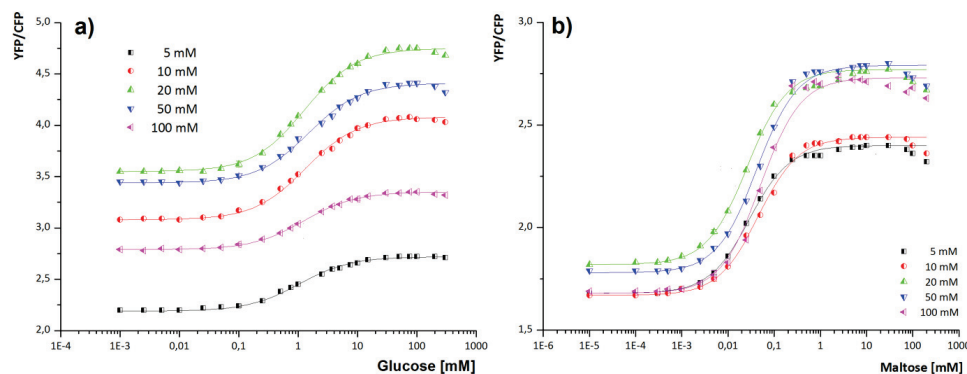


Abbildung 3-7: Titrationskurven a) des Glucosesensors und b) des Maltosesensors bei unterschiedlichen Konzentrationen des MOPS Puffers. Alle Messungen wurden mit $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Sensorprotein in MOPS Puffer bei pH 7,3 und 25°C durchgeführt (Baierl 2011).

Die Untersuchungen der isolierten Fluoreszenzproteine zeigten hingegen kaum signifikante Effekte auf deren Fluoreszenzintensität. Für ECFP stieg die Fluoreszenzemission leicht bei höheren Pufferkonzentrationen von 50 und 100 mM (**Abbildung 3-8**). Wie bereits im Falle des pH-Einflusses beobachtet, sanken bei diesen Pufferkonzentrationen die Fluoreszenzintensitäten der Akzeptormoleküle leicht ab (**Abbildung 3-9**). Insgesamt scheinen diese Effekte jedoch zu schwach zu sein, um die in **Abbildung 3-7** dargestellten Ergebnisse mit den Sensorproteinen erklären zu können.

Daher könnte man in diesem Fall spekulieren, dass hauptsächlich die Bindedomänen von der Variation der Ionenkonzentration beeinflusst werden und weniger die Donor- und Akzeptormoleküle. Diese These konnte durch Folgeexperimente bestätigt werden, die im folgenden Kapitel (3.2.4) beschrieben werden.

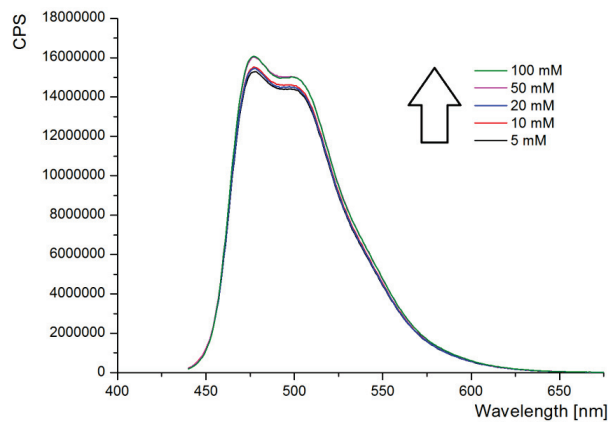


Abbildung 3-8: Fluoreszenzemissionsspektren des Donorproteins ECFP in MOPS Puffern verschiedener Konzentration bei 25 °C. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ bei pH 7,3.

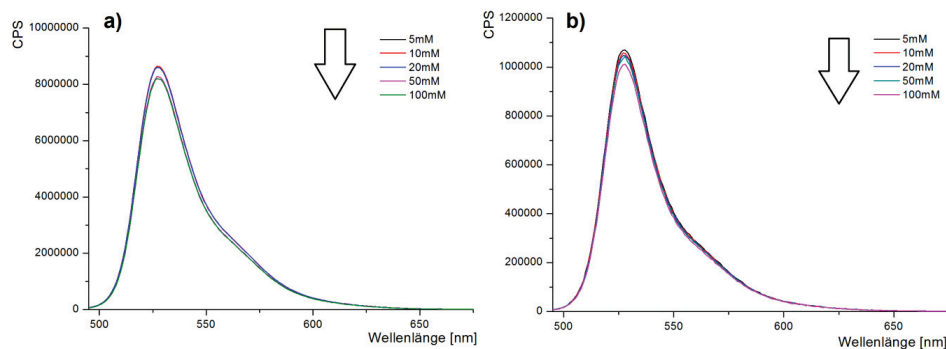


Abbildung 3-9: Fluoreszenzemissionsspektren der Akzeptorproteine a) Citrine und b) EYFP in MOPS Puffern verschiedener Konzentration bei 25 °C. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug jeweils $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ bei pH 7,3.

3.2.3 Einfluss verschiedener Puffersalze auf das Sensorsignal

Aus den vorangegangenen Experimenten lässt sich bereits ableiten, dass die Wahl des Kalibrationspuffers für die *in vitro*-Titrationskurve von fundamentaler Bedeutung ist (**Abbildung 3-3**). Umso mehr verwundert es, dass in der Literatur genau diese Puffer sehr uneinheitlich eingesetzt zu werden scheinen; sowohl was den pH-Wert als auch die Inhaltsstoffe betrifft. Besonders häufig finden sich in der Literatur HEPES, Tris-HCl, Natrium-Phosphat und MOPS Puffer genannt (Deuschle, et al. 2006; Fehr, et al. 2003; Strohhöfer, et al. 2011; Rizzo, et al. 2004).

Um den Einfluss der verschiedenen Puffer auf die Fluoreszenz- und Bindeeigenschaften der Sensoren zu untersuchen, wurden diese, nach Präparation in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3, in die jeweiligen Zielpuffer bei gleicher Konzentration und gleichem pH umgepuffert. **Abbildung 3-10** zeigt die Titrationskurven der beiden Sensoren in den verschiedenen Puffern. Es ist zu erkennen, dass abgesehen vom Natrium-Phosphatpuffer alle Puffer sehr ähnliche Titrationskurven ergeben. Jedoch

beeinflusst der Phosphatpuffer die Intensitäten der FRET-Signale beider Sensoren gegenteilig (**Abbildung 3-10**; hervorgehobene Graphen). Es ergibt sich im Vergleich zu den übrigen Puffern eine Differenz in der Intensitätsänderung der YFP/CFP-ratio von -0,5 beim Glucosesensor (**Abbildung 3-10-a**) und +0,2 beim Maltosesensor (**Abbildung 3-10-b**). Dieses Ergebnis ist von großer Bedeutung, denn bei vielen Sensoren liegt auch die Antwort auf die Metabolitbindung in derselben Größenordnung.

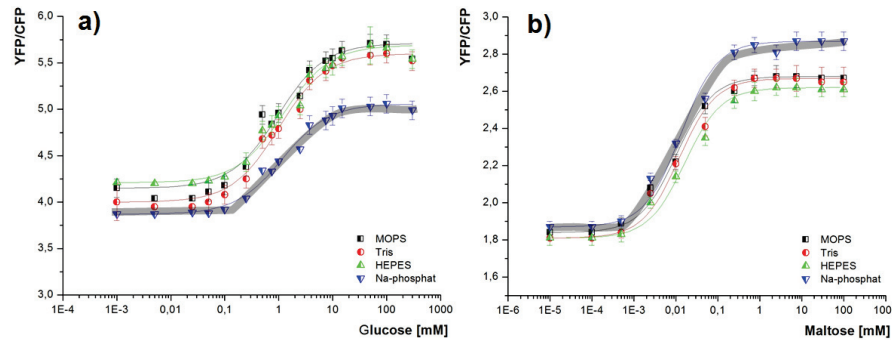


Abbildung 3-10: Kalibration des Glucosesensors a) und des Maltosesensors b) in verschiedenen Puffern. Alle Puffer wurden auf 20 mM und pH 7,3 eingestellt. Die Proteinkonzentration betrug jeweils $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ bei pH 7,3 bei 25°C .

Fazit: Die Kalibration der in dieser Arbeit untersuchten Zuckersensoren ergibt in jeweils 20 mM HEPES, Tris-HCl und MOPS Puffer reproduzierbare Ergebnisse. In Na-Phosphat Puffer wurden jedoch deutliche Abweichungen gefunden, so dass dieser Puffer nicht für die Kalibrierung verwendet werden sollte. Allerdings kann angenommen werden, dass keiner der untersuchten Puffer Bedingungen repräsentiert, wie sie im Zellinneren herrschen. Die Ergebnisse unterstreichen, wie problematisch die bisher verwendete Praxis bei der Anwendung der Sensoren zur Metabolit-quantifizierung ist (**Abbildung 3-3**).

3.2.4 Einfluss von Salzen und Spurenelementen auf das Sensorsignal

Im Zuge der Evaluierung der genetisch kodierten Biosensoren als mögliche Werkzeuge für quantitative Analysen, ergab sich aus den Resultaten der Ionenstärke-Variation und verschiedener Kalibrationspuffer die Frage, ob die Sensoren sensitiv gegenüber bestimmten Salzen sein könnten.

Hierbei muss differenziert werden zwischen Einflüssen durch bestimmte artifizielle Puffer solchen gegenüber ionischen Komponenten, die auch intrazellulär vorkommen. Um dies im Hinblick auf eine potentielle *in vivo* Anwendung der Sensoren konkret für *E. coli* zu untersuchen, wurde der Einfluss verschiedener in *E. coli* vorkommender Salze, Metallionen und Spurenelemente auf die Fluoreszenzeigenschaften der Biosensoren und der Fluoreszenzproteine untersucht. **Tabelle 3-2** zeigt den Auszug aus einer Literaturrecherche in Hinblick auf physiologische Salz- und Spurenelementkonzentrationen in *E. coli* BL21 (DE3). Diese Daten sind jedoch mit Vorsicht zu betrachten, da sich in der Literatur häufig unterschiedlichste Werte für die gleiche Substanz finden. Dies ist vermutlich auf unterschiedliche experimentelle Vorgehensweisen und Versuchsdurchführungen zurückzuführen.

Tabelle 3-1: Physiologische Salz- und Spurenelementkonzentrationen in *E. coli* BL21 (DE3).

Substanz	Konzentration	Quelle
Natrium	5-14 mM	(Lo, Leake et al. 2006)
Calcium	< 200 nM	(Watkins, Knight et al. 1995)
Kalium	200 mM	(Shabala, Bowman et al. 2009)
Magnesium	≤ 40 mM	(Hurwitz and Rosano 1967)
Mangan	15 µM	(Anjem, Varghese et al. 2009)

Abbildung 3-11 und **Abbildung 3-12** zeigen den Einfluss der Salze NaCl, CaCl₂, MgCl₂, KCl, NH₄Cl, MnCl₂, und Na-Phosphat auf die Biosensoren, und zwar sowohl in Anwesenheit des Zuckerliganden (**a**), als auch in dessen Abwesenheit (**b**) (vgl. Kapitel 5.6).

Die Ergebnisse zeigen zwei zentrale Effekte: einerseits steigern CaCl₂, MgCl₂ und MnCl₂ die YFP/CFP-ratio im Bereich zwischen 2-5 mM enorm. Darüber hinaus ist mit allen untersuchten Salzen ein signifikanter Abfall der YFP/CFP-ratio bei Konzentrationen über 20 mM zu erkennen. Verantwortlich für den erstgenannten Effekt dürften die bivalenten Metallionen sein. Dies führt vermutlich zu einer Strukturveränderung der Bindedomänen, ähnlich der bei Zuckerbindung. Da das Experiment sowohl mit, als auch ohne Zucker durchgeführt wurde, lässt sich erkennen, dass der Effekt der bivalenten Kationen immer additiv das FRET-Signal verstärkt. Für die periplasmatische Domäne des Glucosesensors ist ein Bindemotiv für Ca²⁺ beschrieben (Vyas et al., 1987). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass auch Mg²⁺ und Mn²⁺ an dieses Motiv binden und eine äquivalente Veränderung der räumlichen Struktur bewirken können. Der verstärkende Effekt von Calciumchlorid auf das FRET-Signal eines ähnlichen Biosensors wurde kürzlich publiziert und bestätigt die vorliegenden Ergebnisse (Strohhofer, Forster et al. 2011).

Für die Bindedomäne des Maltosesensors ist bislang kein vergleichbares Metallionen-Bindemotiv beschrieben worden. Da der Effekt sich jedoch vollkommen analog darstellt (Abbildung 3-10), ist zu vermuten, dass die molekulare Ursache des beobachteten Effekts bei beiden Sensoren identisch ist. Ob es sich dabei in beiden Fällen um eine spezielle Metallionen-Bindestelle handelt, konnte durch diese Ergebnisse nicht geklärt werden. Hierzu wären z.B. entsprechende Kristallstrukturuntersuchungen erforderlich. Klar auszuschließen ist jedoch ein Einfluss auf die Fluoreszenzproteine, wie man aus den Diagrammen in **Abbildung 3-13** und **Abbildung 3-14** ableiten kann.

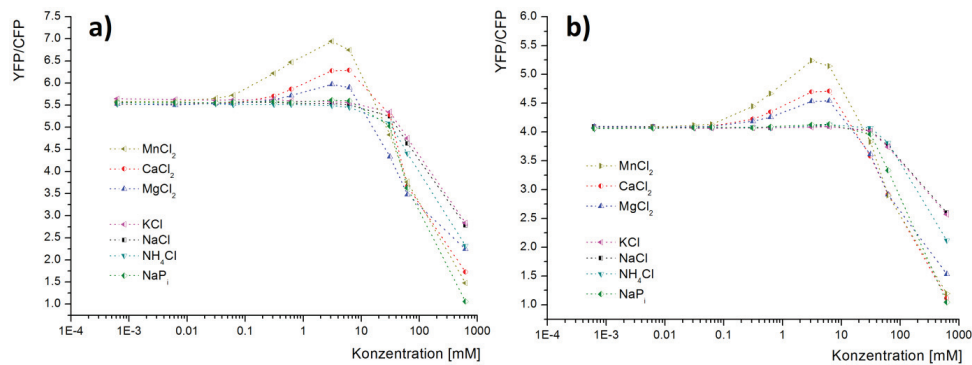


Abbildung 3-11: Konzentrationsabhängiger Einfluss der Salze NaCl, CaCl₂, MgCl₂, KCl, NH₄Cl, MnCl₂ und NaP_i auf die FRET-Signalintensität des Glucosesensors. Der Versuch a) wurde mit 100 mM Glucose durchgeführt; b) als Kontrollansatz ohne Glucose in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3 bei 25 °C mit 0,5 mg·mL⁻¹ Sensorprotein durchgeführt. Die Fluoreszenz ist als relative Intensität angegeben, da die Messung nicht am Fluoreszenzmikroskop, sondern im Tecan Reader vorgenommen wurde.

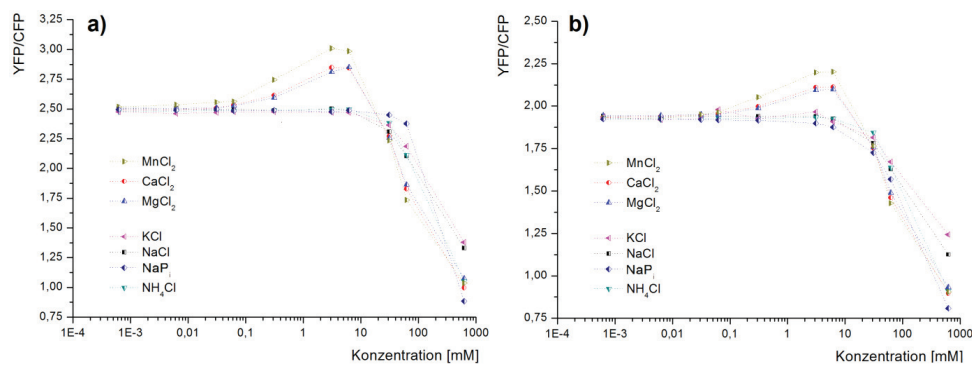


Abbildung 3-12: Konzentrationsabhängiger Einfluss der Salze NaCl, CaCl₂, MgCl₂, KCl, NH₄Cl, MnCl₂, und NaP_i auf die FRET-Signalintensität des Maltosesensors. Der Versuch a) wurde mit 100 mM Maltose durchgeführt; b) als Kontrollansatz ohne Maltose in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3 bei 25 °C mit 0,5 mg·mL⁻¹ Sensorprotein durchgeführt. Die Fluoreszenz ist als relative Intensität angegeben, da die Messung nicht am Fluoreszenzmikroskop, sondern im Tecan Reader vorgenommen wurde.

Hier zeigt sich im entscheidenden Konzentrationsbereich von 2-5 mM kein Einfluss auf die Fluoreszenz. Darüber hinaus stellen sich die im Bereich > 20 mM beobachteten Effekte bei den Fluoreszenzproteinen sehr heterogen, wobei man berücksichtigen muss, dass es sich hierbei um Einzelmessungen handelt, die zwar Tendenzen erkennen lassen, wobei einzelne Datenpunkte nicht belastbar sind. Entsprechend zeigen die Ergebnisse für ECFP und Citrine eine ausgeprägte Unempfindlichkeit des Fluoreszenzsignals selbst gegenüber hohen Salzkonzentrationen kaum eine Veränderung der Fluoreszenzintensität (Abbildung 3-11, 3-12). Eine Ausnahme bildet in beiden Fällen das Na-phosphat. Hier zeigt sich bei Konzentrationen über 10 mM eine Abnahme der Fluoreszenzintensitäten (Abbildung 3-12 b). Demgegenüber zeigt EYFP einen sehr ausgeprägten Abfall in der Fluoreszenzintensität mit steigender Salzkonzentration (Abbildung 3-12a). Dies scheint jedoch nicht von großer Bedeutung für die Effekte auf die ganzen Biosensoren zu sein, denn sonst

wären die Resultate von Glucose- und Maltosesensor unterschiedlich, da nur letzterer EYFP trägt. Vielmehr ähneln sich die Resultate beider Sensoren jedoch.

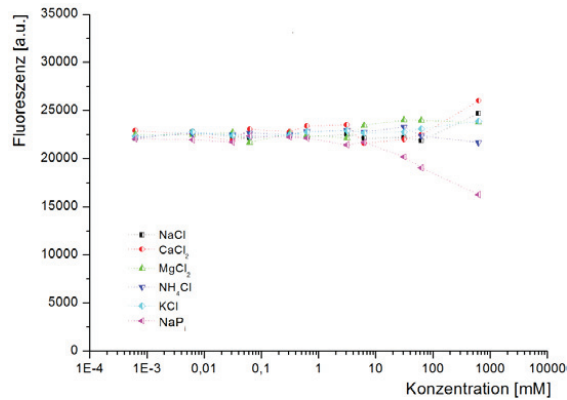


Abbildung 3-13: Einfluss verschiedener Konzentrationen der Salze NaCl, CaCl₂, MgCl₂, KCl, NH₄Cl, MnCl₂, und NaPi auf die Fluoreszenzemission von ECFP. Die Fluoreszenz ist als relative Intensität angegeben, da die Messung nicht am Fluoreszenzmikroskop, sondern im Tecan Reader vorgenommen wurde. 0,5 mg·mL⁻¹ Proteinkonzentration in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3 bei 25 °C.

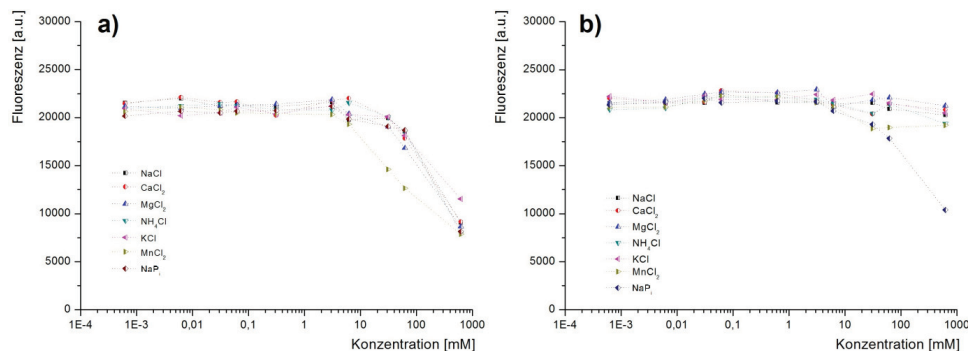


Abbildung 3-14: Einfluss verschiedener Konzentrationen der Salze NaCl, CaCl₂, MgCl₂, KCl, NH₄Cl, MnCl₂, und NaPi auf die Fluoreszenzemission von a) EYFP und b) Citrine. Die Fluoreszenz ist als relative Intensität angegeben, da die Messung nicht am Fluoreszenzmikroskop, sondern im Tecan Reader vorgenommen wurde. 0,5 mg·mL⁻¹ Proteinkonzentration in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3 bei 25 °C.

Fazit: Berücksichtigt man die physiologischen Literaturwerte aus **Tabelle 3-1** so könnte im Falle von Magnesium, dass mit bis zu 40 mM intrazellulär in *E. coli* vorkommen soll, eine kritische Konzentration vorliegen, da bis 20 mM eine Steigerung der FRET-Intensität für beide Sensoren zu erkennen war. Mn²⁺- und Ca²⁺-Ionen scheinen hingegen in diesem Bakterium nicht in entsprechenden Konzentrationen vorzukommen. Jedoch muss hierbei auch berücksichtigt werden, dass die getesteten Biosensoren Organismen-übergreifend eingesetzt werden und entsprechend individuell andere Salz- und Spurenelement-Zusammensetzungen vorliegen können. In jedem Fall ist hochinteressant, dass der Ligand-verursachte Anstieg der FRET-ratio zusätzlich durch die Anwesenheit dritter Substanzen gesteigert werden kann.

3.2.5 Einfluss verschiedener Zellmetabolite auf das Sensorsignal

Basierend auf den beschriebenen Effekten, die mit verschiedenen Puffern und Salzen auf die Fluoreszenz- und Bindeeigenschaften der Sensoren beobachtet wurden, wurden anschließend der Einfluss verschiedener Zellmetabolite, wie ATP, ADP, AMP, NAD^+ , NADH , NADP^+ , NADPH , sowie cGMP und GTP auf die Biosensoren und die isolierten Fluoreszenzproteinen analysiert (Messanordnung siehe **Abbildung 5-10**). Aufgrund des enormen experimentellen Aufwands wurde diese Serie nur ein Einfachbestimmung durchgeführt. Alle Substanzen wurden zudem auf interferierende Eigenfluoreszenz untersucht und, wie im Fall von NADH zur Basislinienkorrektur heraus gerechnet (Kapitel 5.6).

Die Ergebnisse in **Abbildung 3-15** zeigen, dass mit steigender Konzentration in der Reihenfolge $\text{ATP} > \text{ADP} > \text{AMP}$ die YFP/CFP-Ratio beider Biosensoren deutlich sinkt, wobei die Effekte beim Glucosesensor ausgeprägter sind als beim Maltosesensor. Der Glucosesensor zeigt bei einer mittleren Konzentration von 10 mM ATP mit und ohne Glucose weniger als 50 % des ursprünglichen FRET-Signals, beim Maltosesensor sind es 25-30 %. Auch ADP beeinflusst die Fluoreszenzeigenschaften beider Sensoren deutlich: 10 mM ADP reduzieren die YFP/CFP-Ratio des Glucosesensors um 40 %, beim Maltosesensor sind es 20 %. Demgegenüber sind die Effekte von AMP deutlich schwächer.

Adenosin-Phosphate

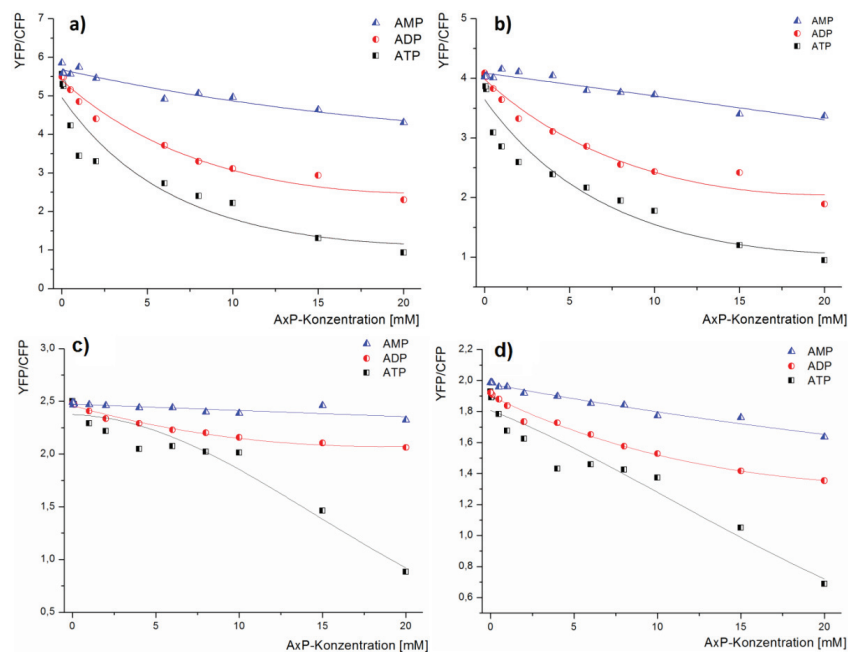


Abbildung 3-15: Einfluss von AMP, ADP und ATP auf die FRET-Signalintensität des Glucose- a), b) und Maltosesensors c), d). Die Versuche a) und c) wurde mit 100 mM Glucose bzw. Maltose durchgeführt; b) und d) sind Kontrollansätze ohne Zucker. $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Proteinkonzentration in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3 bei 25 °C.

Um abschätzen zu können, in wie weit die untersuchten Konzentrationsbereiche für die Adenosinphosphate physiologisch relevant sind, wurden die Ergebnisse mit aktuellen Literaturwerten in **Tabelle 3-2** verglichen. Demnach liegt ATP in einer Konzentration von ca. 10 mM, während für ADP und AMP Konzentrationen deutlich unter 1 mM gefunden wurden.

Tabelle 3-2: Physiologische Konzentrationen von Adenosinmono-, di- und triphosphat in *E. coli* (Bennett, Kimball et al. 2009).

Kofaktor	Konzentration in <i>E.coli</i> [mM]
AMP	0,28
ADP	0,56
ATP	9,6

Basierend auf den Ergebnissen in Abbildung 3-14 und 3-15 kann demnach geschlossen werden, dass unter physiologischen Bedingungen die mit ATP beobachtete Reduktion der YFP/CFP-ratio unmittelbar zum Tragen kommen müssen. Selbst ADP (0,56 mM) würde beim Glucosesensor immerhin noch einen Intensitätsverlust von 7 % verursachen. Hingegen spielt AMP wohl keine Rolle. Die Untersuchung der isolierten Fluoreszenzproteine gibt einen Hinweis auf die Ursache für den Verlust der FRET-Signalintensität. Es ist gut zu erkennen, dass bei AMP weder das Donorprotein ECFP, noch die Akzeptorproteine EYFP und Citrine Intensitätsverluste zeigen (**Abbildung 3-16**).

Analog zu den Untersuchungen der Biosensoren verändert sich dieser Trend jedoch und die Signalintensität sinkt von ADP hin zu ATP immer stärker (**Abbildung 3-16-b+c**). Hierbei lässt sich erkennen, dass die Akzeptormoleküle wesentlich stärker beeinträchtigt werden, als ECFP.

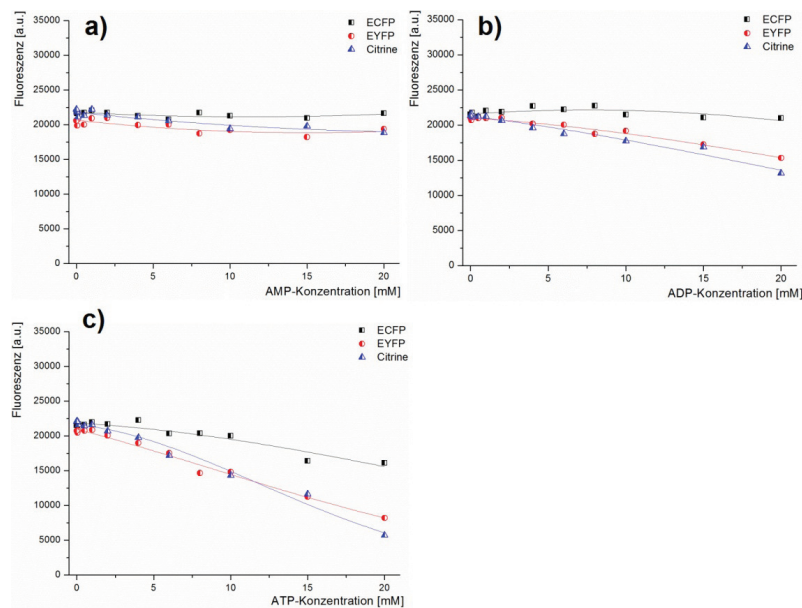


Abbildung 3-16: Einfluss verschiedener Konzentrationen von a) AMP, b) ADP und c) ATP auf die Fluoreszenzemission von ECFP, EYFP und Citrine. 0,5 mg·mL⁻¹ Proteinkonzentration in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3 bei 25 °C.

In der Literatur findet sich eine ähnliche Untersuchung zum Einfluss von ATP auf ECFP (Borst, Willemse et al. 2010). Die Autoren führen den Einfluss von ATP auf eine Interaktion mit der Aminosäure Histidin an Position 148 von ECFP zurück, jedoch ohne konkretere Interpretation der molekularen Effekte. Sie beobachteten lediglich, dass bei einer anderen ECFP-Variante (*Cerulean*), die an dieser Stelle kein Histidin aufweist, dieser Effekt nicht auftrat. Im Abschnitt *Zusammenfassende Diskussion und Ausblick* wird vertiefend auf diese Interpretation eingegangen.

Fazit: Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Adenosinphosphate hauptsächlich auf die Fluoreszenzeigenschaften der GFP-Derivate auszuwirken scheinen, wobei ein Einfluss auf die Bindedomänen nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Berücksichtigt man, dass diese Verbindungen *in vivo* zeitgleich vorhanden sind und sich somit auch additiv auswirken könnten, stellt auch diese experimentelle Serie die Anwendbarkeit der Biosensoren *in vivo* in Frage.

Nicotinamidadenindinukleotide

Analog zu den Untersuchungen der Adenosin-Phosphate wurde ebenfalls der Einfluss der Nicotinamidadenindinukleotide NAD^+ , NADH , NADP^+ und NADPH auf die FRET-Signalintensität der Biosensoren, sowie der Fluoreszenzproteine ECFP, EYFP und Citrine in analoger Weise analysiert (Messanordnung siehe **Abbildung 5-10**). Für alle Versuche wurden die Daten Basislinien-korrigiert, bezüglich einer möglichen Eigenfluoreszenz der Redoxcofaktoren bei den verwendeten Wellenlängen (vgl. Kapitel 5.6).

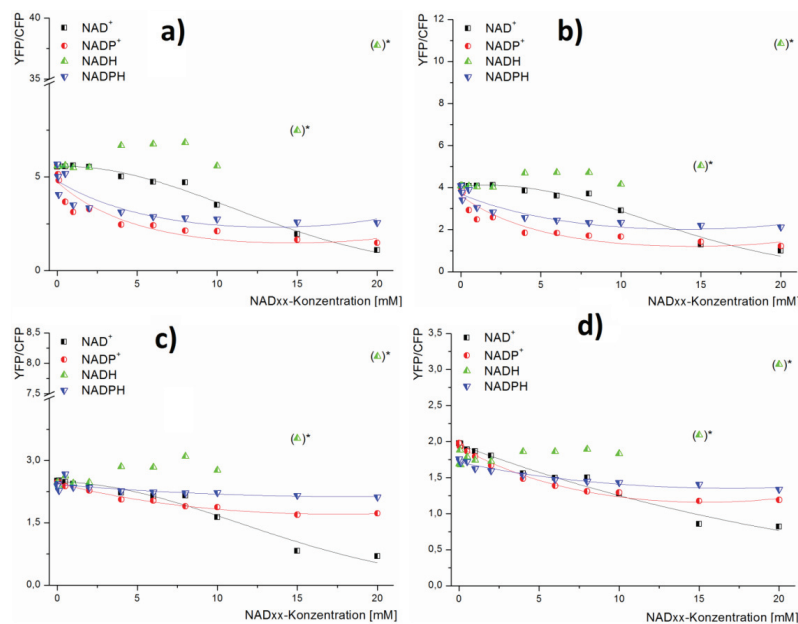


Abbildung 3-17: Einfluss von NAD^+ , NADH , NADP^+ und NADPH auf die FRET-Signalintensität des Glucose- a), b) und Maltosesensors c), d). Der Versuch a) wurde mit 100 mM Glucose durchgeführt; b) als Kontrollansatz ohne Glucose. c) wurde mit 100 mM Maltose durchgeführt; d) als Kontrollansatz ohne Maltose. Bei den Ansätzen mit NADH tritt in höheren Konzentrationen vermutlich Fluoreszenzlösung auf, was den Fluoreszenzquotienten verfälscht. Die besonders auffälligen Datenpunkte wurden mit (*) gekennzeichnet.

Abbildung 3-17-a+b zeigt das Ergebnis dieser Untersuchungen für den Glucosesensor. Es wird deutlich, dass die phosphorylierten Cofaktoren, die ein phosphoryliertes Adenosin tragen (NADP^+ , NADPH) bei gleicher Konzentration zu einem stärkeren Intensitätsverlust führen, als NAD^+ und NADH . Bereits bei einer Konzentration von 500 μM verursacht NADP(H) einen drastischen Abfall der YFP/CFP-ratio von 20 - 25 %; bei 4 mM sind es bereits 50 %. NAD^+ hingegen bewirkt keine derart exponentielle Abnahme des FRET-Verhältnisses. Vielmehr nimmt dieses mit steigender NAD^+ -Konzentration quasi kontinuierlich ab. Für NADH lässt sich zudem feststellen, dass die Datenpunkte bezüglich einer Eigenfluoreszenz von NADH nicht durch Subtraktion der Leermessungen zufriedenstellend korrigiert werden konnten. Die besonders auffälligen Messpunkte wurden in der Grafik mit ()* gekennzeichnet. Die Tatsache, dass die Eigenfluoreszenz von NADH nicht einfach abgezogen werden kann, gibt einen Hinweis darauf, dass es sich nicht um einen unabhängigen Effekt handelt. Vielmehr scheinen bei den gekennzeichneten Konzentrationsbereichen photophysikalische Wechselwirkungen aufzutreten, die sich häufig bei hohen Konzentrationen von fluoreszierenden Substanzen zeigen. Hierzu gehört beispielsweise Fluoreszenzlöschung (*quenching*) z.B. als Resultat von Komplex-Bildungen, interner Konversion oder der Energie-Übertragung auf andere Moleküle (vgl. Kapitel 1.1).

Unter physiologischen Bedingung beträgt die NADH Konzentration in *E. coli* jedoch weniger als 100 μM (Bennett, Kimball et al. 2009) , bei der sich zumindest in vitro unter der beschriebenen Messanordnung kein Abfall der YFP/CFP-ratio zeigte. Näheres hierzu wird in Zusammenhang mit den Resultaten diskutiert, die mit den isolierten Fluoreszenzproteinen gemessen wurden (s.u.).

Die Eigenfluoreszenz von NADPH war bei der verwendeten Anregungswellenlänge von 428 nm vernachlässigbar, da das Anregungsmaximum bei 260 nm liegt. Entsprechend war bei NADPH keine Form von Fluoreszenzlöschung zu beobachten. Die oxidierten Cofaktoren NAD(P)^+ zeigen keine Eigenfluoreszenz.

Für den Maltosesensor hingegen zeigte ich ein durchaus anderes Resultat (**Abbildung 3-17-c+d**). NAD^+ bewirkt zwar ähnlich wie beim Glucosesensor eine fast kontinuierliche Abnahme der Fluoreszenz mit der Zunahme dieser Kofaktor-Konzentration. Im Verhältnis dazu scheinen die übrigen Cofaktoren sich jedoch weniger drastisch auszuwirken, als bei dem Glucosesensor. Doch ist auch hier erkennbar, wenn auch deutlich weniger ausgeprägt als beim Glucosesensor, dass die phosphorylierten $\text{NADP}^+(\text{H})$ -Moleküle das YFP/CFP-Verhältnis mit steigender Konzentration negativ zu beeinflussen.

Um einen genaueren Einblick in die Ursachen für die beobachteten Phänomene zu erhalten, wurde anschließend der Einfluss der Redoxcofaktoren auf die isolierten Fluoreszenzproteine untersucht (**Abbildung 3-18**). Aus **Abbildung 3-18-a** ist ersichtlich, dass die Fluoreszenzemission von ECFP durch NAD^+ weniger stark geschwächt wird, als EYFP und Citrine, wobei bis 6 mM ein ähnlicher Verlauf beobachtet wurde. Bei den Akzeptormolekülen kommt es bei einer NAD^+ -Konzentration über 15 mM sogar zur vollständigen Fluoreszenzlöschung; ECFP hingegen büßt gleichzeitig lediglich etwa 30 % Fluoreszenzintensität ein.

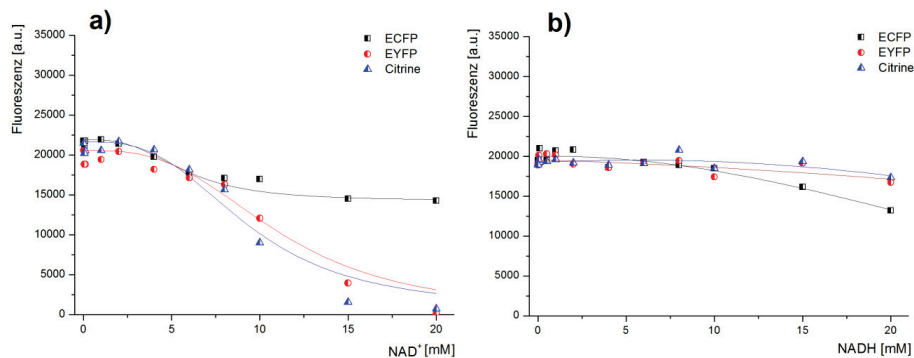


Abbildung 3-18: Konzentrationsabhängiger Einfluss von a) NAD^+ und b) NADH auf die Fluoreszenzemission von ECFP, EYFP und Citrine. Proteinkonzentration $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3 bei 25°C .

Wie bereits zuvor erwähnt ließ sich die Eigenfluoreszenz von NADH nicht kontinuierlich aus den Ergebnisdaten der ganzen Biosensoren herausrechnen. So ergaben sich beim Experiment mit dem Glucosesensor beispielsweise scheinbar exponentiell ansteigende YFP/CFP- ratio Werte bei höheren Konzentrationen (**Abbildung 3-18-a**). **Abbildung 3-18-b** hingegen zeigt, dass die Basislinienkorrektur mit den isolierten Fluoreszenzmolekülen möglich war. Hier zeigte sich sowohl für ECFP, als auch für EYFP und Citrine kaum eine Veränderung der Fluoreszenz bei steigender NADH -Konzentration. Einzig die Fluoreszenzintensität von ECFP fiel bei Werten $> 10 \text{ mM}$ um bis zu 20 % ab. Dies unterstreicht die Vermutung, dass es sich bei den mit den Biosensoren beobachteten Daten um ein komplexes photophysikalisches Phänomen handelt, das vermutlich auf der Überlappung des Emissionsspektrums von NADH mit den Anregungs- und Emissionsspektren von CFP und YFP überlappt (nach Anregung bei 428 nm) (**Abbildung 3-19**). Das Anregungsspektrum von NADH wurde der Übersichtlichkeit halber nicht in die Abbildung integriert.

Regt man eine Probe, die all diese Komponenten enthält nun bei 428 nm an, so regt man damit zunächst ECFP und NADH direkt an. ECFP könnte anschließend über FRET EYFP bzw. Citrine anregen, da die entsprechenden Voraussetzungen in den Biosensoren gegeben sind. Die Emission des NADH wiederum kann durch die Überlappung mit beiden Anregungsspektren erneut ECFP und gleichzeitig auch EYFP/Citrine anregen. Es dürfte damit die EYFP/Citrine-Anregung unberechenbar intensivieren. Nicht zuletzt emittiert NADH im gleichen spektralen Bereich wie EYFP/Citrine und teilweise auch ECFP. Allein die strahlungslosen Energieübergänge zwischen den beteiligten Molekülen sind Grund genug dafür, dass die Basislinienkorrektur nicht einfach durch Subtraktion möglich sein dürfte. Vereinfacht man hingegen die Zusammensetzung der Messlösung und vermeidet die gleichzeitige Präsenz der FRET-Partner CFP und YFP, scheint die Basislinienkorrektur des Signals möglich zu sein, wie **Abbildung 3-18** zeigt.

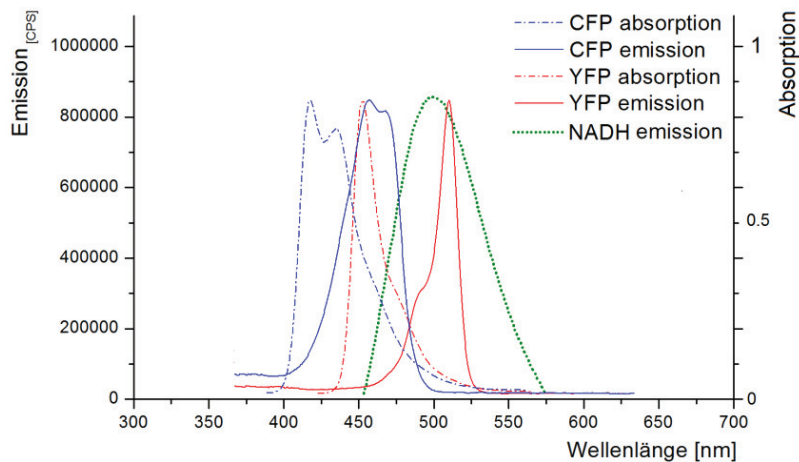


Abbildung 3-19: Anregungs- und Emissionsspektren von ECFP (blau) und EYFP bzw. Citrine (rot). Zudem das Emissionsspektrum von NADH nach Anregung bei 428 nm (grün). Die Emissionsspektren wurde mittels Fluoreszenzphotometer vorgenommen; die Absorptionsspektren im gewöhnlichen Photometer. Eingesetzt wurden je $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Proteinkonzentration in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3 bei 25 °C. Anschließend wurden die Spektren so normiert, dass die Darstellung homogen ausfiel.

Im Falle von NADP^+ und NADPH zeigte sich ebenfalls, dass ECFP und die Akzeptormoleküle unterschiedlich auf die Anwesenheit der phosphorylierten Nicotinamadenindinukleotide reagieren (**Abbildung 3-20**). EYFP/Citrine zeigen eine kontinuierliche Abnahme der Fluoreszenzintensität mit steigender NADP^+ -Konzentration (**Abbildung 3-20-a**). Die scheinbar unterschiedlichen Einflüsse auf die EYFP-Fluoreszenz im Vergleich zu Citrine sollte aufgrund der Einfachbestimmung nicht überbewertet. Hingegen steigt die Emissionsintensität des Donors ECFP um bis zu 25 %; ein sehr gegensätzlicher Trend, der die Ergebnisse mit den Biosensoren teilweise erklärt. Dort zeigten $\text{NADP}^+(\text{H})$ die stärksten Effekte, was sich mit der asynchronen Sensitivität stimmig deuten lässt, wenn man berücksichtigt, dass aus diesen Emissionswerten ein Quotient gebildet wird. Folglich würde der Divisor (ECFP) im Bruch größer und der Dividend (EYFP/Citrine) gleichzeitig kleiner. Als Resultat sinkt der Quotient.

Gegenüber NADPH zeigen EYFP und Citrine kaum Empfindlichkeit; auch hier steigt jedoch die Donoremission um bis zu 15 %. Die Analyse der isolierten GFP-Derivate erbrachte somit vor allen Dingen Hinweise darauf, dass ECFP anders von den Nicotinamid-Cofaktoren beeinflusst wird, als die gelben Fluoreszenzproteine. Zudem konnte die These weiter untermauert werden, dass in Anwesenheit von hohen NADH-Konzentrationen komplexe photophysikalische Prozesse auftreten, die das Messergebnis verfälschen können. Diese liegen jedoch zumindest für *E. coli* weit außerhalb des physiologischen Bereichs von $\sim 100 \text{ } \mu\text{M}$ (Bennett, Kimball et al. 2009; vgl. **Tabelle 3-3**).

Tabelle 3-3: Literaturangaben über die physiologischen Konzentrationen von NAD^+ , NADH , NADP^+ und NADPH in *E. coli* (Bennett, Kimball et al. 2009)

Kofaktor	Konzentration in <i>E. coli</i> [mM]
NAD^+	2,6
NADH	0,083
NADP^+	0,0021
NADPH	0,21

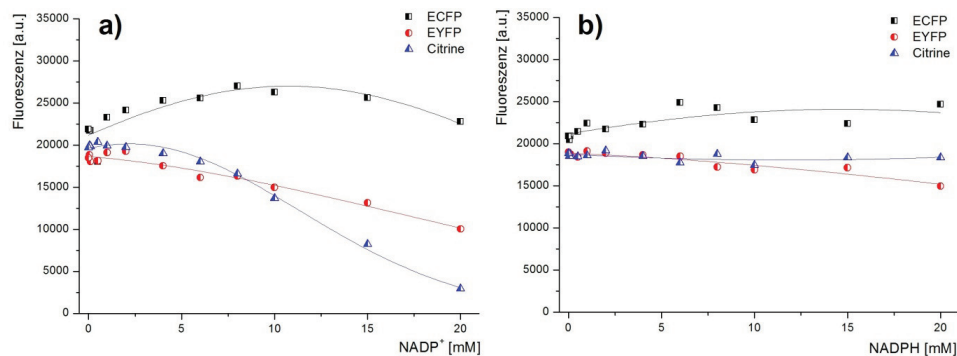


Abbildung 3-20: Konzentrationsabhängiger Einfluss der getesteten Nicotinamadenindinukleotidphosphate a) NADP^+ und b) NADPH auf die Fluoreszenzemission von ECFP, EYFP und Citrine. Eingesetzt wurden je $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Proteinkonzentration in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3 bei 25°C .

Fazit: Entsprechend der Daten in **Tabelle 3-3** liegen weder NAD^+ , NADP^+ noch NADH *in vivo* in einer bezüglich der beschriebenen Ergebnisse kritischen Konzentration vor. Eine NADPH -Konzentration von 0,21 mM würde entsprechend der vorliegenden Daten beim Glucosesensor zu FRET-Signalverlusten von 15 % führen. Es sollte aber festgehalten werden, dass die Konzentrationen der Nicotinamidcofaktoren in Bakterienzellen je nach Zellzyklus und metabolischen Status starken Schwankungen unterliegen. Darüber hinaus reagieren die isolierten GFP-Derivate sehr unterschiedlich auf die Nicotinamadenindinukleotide. Selbst bei Substanzen bei denen eine Basislinienkorrektur aufgrund mangelnder Eigenfluoreszenz unnötig war (NAD^+ , NADP^+) zeigte sich ein sehr heterogenes Bild (**Abbildung 3-20**). Die Überlappung der Anregungs- und Emissionsspektren aller Verbindungen im Reaktionsansatz machte am Beispiel von NADH eine Abschätzung über intrazelluläre Wechselwirkungen unmöglich, da die Komplexität bereits einen korrekten Basislinienausgleich bei höheren Konzentrationen unmöglich machte.

Guanosinphosphate

Abschließend wurde der Einfluss von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) sowie Guanosin-triphosphat (GTP) auf die Sensorproteine und die einzelnen Fluoreszenzproteine untersucht.

Abbildung 3-21 zeigt den konzentrationsabhängigen Einfluss dieser Substanzen auf die beiden Biosensoren. Es ist gut zu erkennen, dass analog zu den Untersuchungen mit den Adenosin-Phosphaten, der Einfluss des Triphosphats auf die Signalintensität wesentlich stärker ist, als der des cyclischen Monophosphats. Im Falle des Maltosesensors zeigt cGMP keinen signifikanten Einfluss auf das FRET-Verhältnis, wohingegen beim Glucosesensor ein Signalabfall bis 10 % feststellbar ist. GTP hingegen verursacht beim Glucosesensor einen Signalabfall bis zu 50 %; beim Maltosesensor sind es 25 %.

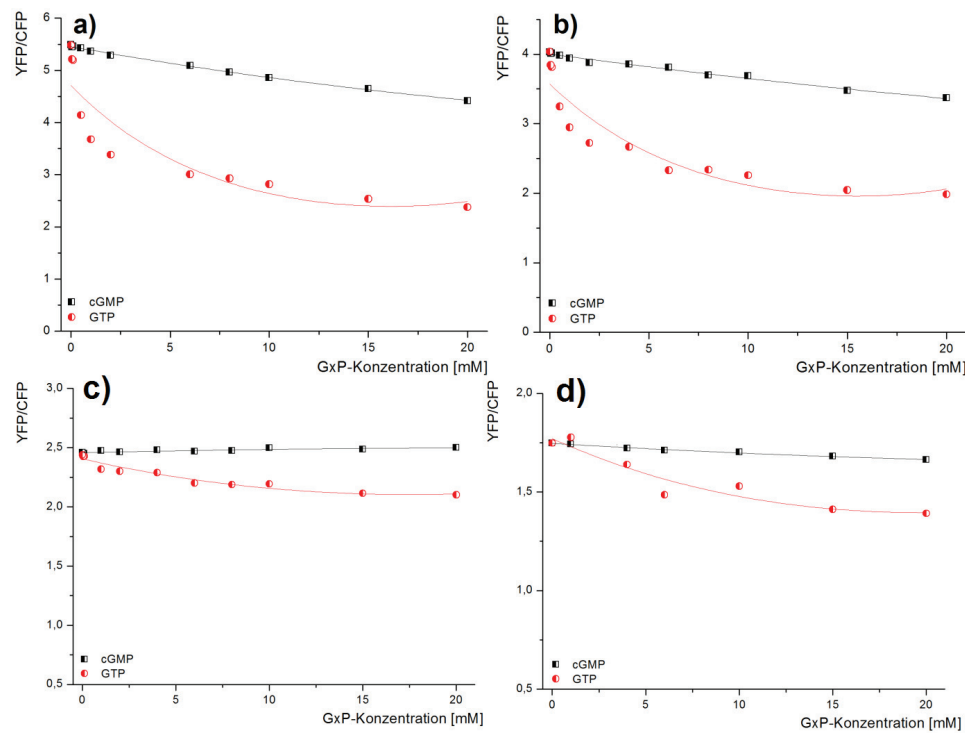


Abbildung 3-21: Einfluss von cGMP und GTP auf die FRET-Signalintensität des Glucose- a)+b) und Maltosesensors c)+d). Die Versuche a)+c) wurde mit 100 mM Glucose/Maltose durchgeführt; b)+d) als Kontrollansatz ohne Zucker. Eingesetzt wurden je $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Proteinkonzentration in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3 bei 25 °C.

Im Gegensatz zu den Adenosin-Phosphaten ergab die Untersuchung der Fluoreszenzproteine EYFP und Citrine keinen signifikanten Einfluss beider Substanzen, was zunächst die Vermutung nahelegen könnte, dass sich der Einfluss vielmehr auf die Bindedomäne bezieht, als auf die GFP-Varianten (**Abbildung 3-22**). Jedoch zeigt sich bei genauerer Betrachtung des ECFP-Signals ein Anstieg von bis zu 20 % in Gegenwart von GTP. Da dieses Protein bei beiden Sensoren als FRET-Donor agiert, könnte

dies die Signalveränderung im YFP/CFP-Quotienten der beiden Biosensoren zumindest teilweise erklären. Ein Effekt auf die Binde-domäne kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da alleine der Einfluss auf das ECFP nicht ausreicht, um den teilweise sehr starken Signalabfall beider Sensoren zu erklären.

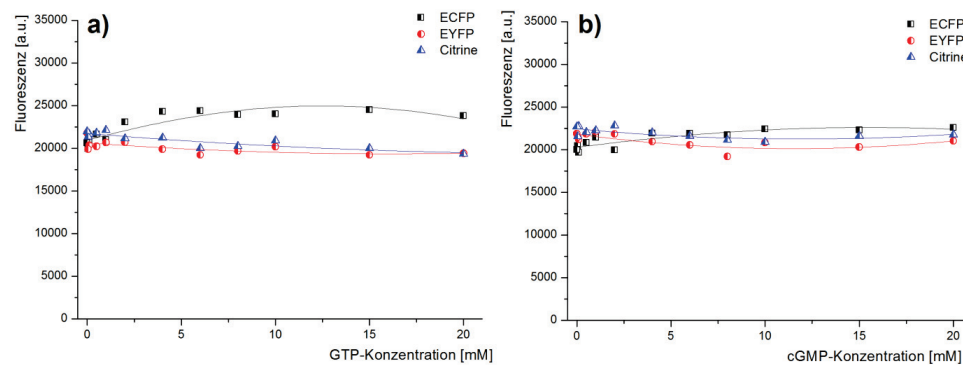


Abbildung 3-22: Konzentrationsabhängiger Einfluss von a) GTP und b) cGMP auf die FRET-Signalintensität der Fluoreszenzproteine ECFP, EYFP und Citrine. Eingesetzt wurden je $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Proteinkonzentration in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3 bei 25 °C.

Fazit: Bennet et al. geben die intrazelluläre Konzentration an GTP mit 0,49 mM an, während sich für cGMP keine Angabe finden (Bennett, Kimball et al. 2009). Vor allem beim Glucosesensor wäre die intrazelluläre GTP-Konzentration bereits mit einer signifikanten Abnahme der Fluoreszenz von ~ 25 % verbunden.

3.2.6 Messungen in *E. coli* Rohzelleextrakt

Für die Annäherung der Sensorcharakterisierungen an die Bedingungen in der lebenden Zelle, sollten als weiterführende Versuche Experimente in *E. coli*-Rohzelleextrakt durchgeführt werden. Der Hintergrund dieser Überlegung war, dass sich im Rohzelleextrakt die natürlichen Komponenten wiederfinden, wie sie auch (annähernd) *in vivo* vorliegen und so mögliche Wechselwirkungen deutlich werden könnten. Wie in Kapitel 5.6 dargestellt, wurden hierfür die gewonnen Bakterienpellets in Konzentrationen von 5 %, 10 % und 20 % (w/v) Biofeuchtmasse resuspendiert und aufgeschlossen (**Abbildung 3-24**). Es wurden verschiedene Mengen an Biofeuchtmasse eingesetzt, um den Einfluss der Verdünnung durch die Resuspendierung mitzuverfolgen.

Die Pellets wurden entsprechend des Zielexperiments direkt in dem jeweiligen Analysepuffer aufgeschlossen; also mit variierender Konzentration oder pH, da ein späteres Umpuffern nicht möglich war. Die Konzentration der exprimierten Sensoren im jeweiligen Rohzelleextrakt wurde über die spezifische Absorption der Akzeptormoleküle ermittelt.

Diese Untersuchungen brachten eine erhebliche Steigerung der Analysekomplexität mit sich. Zum einen handelt es sich bei Rohzelleextrakt um eine undefinierte Komposition von Substanzen, die alle möglicherweise einen Einfluss auf die Fluoreszenz- und Bindeeigenschaften der Sensoren haben könnten. Darüber hinaus kann die Konzentration der funktionalen Biosensoren im Rohextrakt nicht mehr definiert werden, da sich diese aus dem Expressionsverhalten der Zellen und der Reifung der GFP-Chromophore zusammensetzt, es sei denn, man fügt die gereinigten Sensorproteine zu einem

Rohzelleextrakt mit Leervektor hinzu. Letzteres ist jedoch weniger geeignet, *in vivo* Bedingungen nachzustellen, da Zellen, die rekombinante Proteine (wie Biosensoren) exprimieren aufgrund des damit verbundenen Stresses vermutlich eine geänderte Metabolitverteilung aufweisen, was wiederum das Sensorsignal unterschiedlich beeinflussen könnte. Daher mussten Wege gefunden werden, die Konzentration an Biosensoren in den Zellen möglichst genau zu quantifizieren.

Die Lösung für diese Fragestellung lag in den Absorptionsmaxima der GFP-Varianten. Denn durch die spezifische Absorption und den sehr hohen Extinktionskoeffizienten von $83400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (EYFP) oder $77,00 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Citrine) der gelb-fluoreszierenden Proteine, konnte über eine Absorptionsmessung ein spezifisches Maximum bei 517 nm detektiert werden, was in *E. coli*-Rohzelleextrakt mit einem Leervektor nicht auftritt.

Abbildung 3-23 zeigt die Absorptionsspektren mit *E. coli*-Rohzelleextrakt mit einem Leervektor, bei dem spezifische Mengen an gereinigtem Glucosensor zugegeben wurden, und zwar bis zu $0,7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Es ist gut zu erkennen, dass das Absorptionsmaximum für das cyanfarbene ECFP bei 428 nm sehr viel schlechter vom Hintergrund zu unterscheiden ist, als das des YFPs bei 517 nm. Dies ist auf den höheren Extinktionskoeffizienten des YFPs (hier: Citrine; $77000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) zurückzuführen (Newman, Fosbrink et al. 2011). Auf diese Weise lassen sich selbst kleinste Mengen an Biosensor Rohzelleextrakts (gepunktete Linie) detektieren.

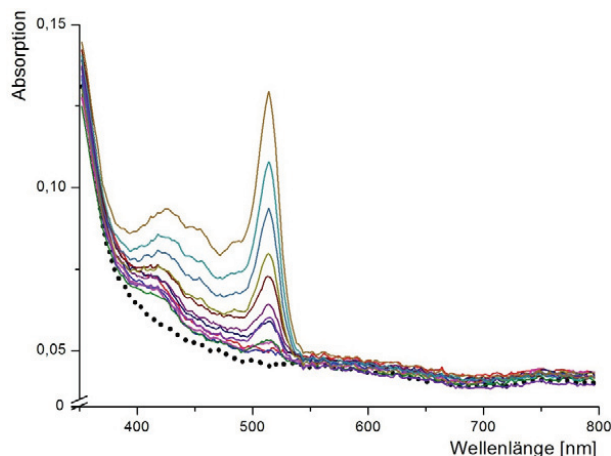


Abbildung 3-23: Absorptionsspektren verschiedener Konzentrationen des Glucosensors ($0,01 - 0,7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) in Rohzelleextrakt von *E. coli* BL21 (DE3). Die schwarze gepunktete Linie stellt die Negativkontrolle von Rohzelleextrakt mit Leervektor dar. Das Endvolumen entsprach jeweils $100 \mu\text{L}$, 25°C , 20 mM MOPS Puffer.

Für die ersten Messungen im Rohzelleextrakt wurden die Sensor-exprimierenden *E. coli*-Zellen nach der angegebenen Standardmethode kultiviert und pelletiert (Kapitel 5.5). Um verschiedene Biosensorkonzentrationen untersuchen zu können, wurden die Pellets in verschiedenen Konzentrationen resuspendiert, und zwar als $5 \% \text{ w/vol}$, $10 \% \text{ w/vol}$ und $20 \% \text{ w/vol}$ Biofeuchtmasse.

Abbildung 3-24 zeigt die unterschiedliche Färbung dieser Suspensionen. Die Konzentration an enthaltenem Biosensor wurde über die zuvor beschriebene Methode festgestellt. $5 \% \text{ w/vol}$ Biofeuchtmasse entsprachen demnach etwa $0,3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $10 \% \text{ w/vol}$ ca. $0,65 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ und $20 \% \text{ w/vol}$ rund $1,4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

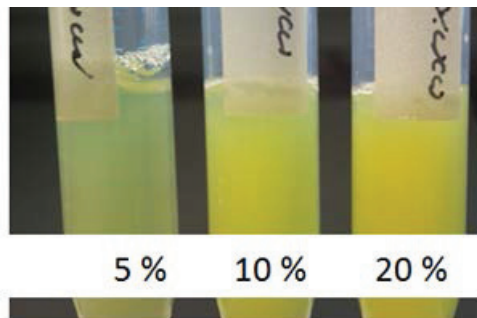


Abbildung 3-24: Suspensionen an *E. coli* BL21 (DE3) Rohzelleextrakten mit verschiedener Bioflüssigmassekonzentration (w/v) resuspendiert und aufgeschlossen in MOPS Puffer.

Es wurde leider schon nach den ersten Messserien offenkundig, warum weitere Untersuchungen mit diesen Biosensoren im Rohzelleextrakt keinen Sinn machen würden. **Abbildung 3-25** zeigt eine zeitlich aufgelöste Messung des Maltosesensors im Rohzelleextrakt. Bereits nach 5 Minuten Inkubationszeit sanken vor allem die ersten 4 Messpunkte des unteren Plateaus vom YFP/CFP-Verhältnis 1,8 auf 1,6 ab. Auch alle weiteren Datenpunkte dieses Messzeitpunkts verschoben sich relativ zu den *in vitro* beobachteten Werten (vgl. **Abbildung 1-15**). Bei den weiteren Messung nach 30 und 120 Minuten setzte sich dieses Phänomen fort, d.h. der K_D -Wert verschob sich scheinbar zu höheren Konzentration und während das untere Plateau der Messkurve weiter sank, blieb das obere nach 30 min bei einer YFP/CFP-ratio von ca. 2,1 stabil. Als Grund für die beobachteten Effekte wurde die Metabolisierung der Maltose durch Enzyme im *E. coli* Rohextrakt vermutet.

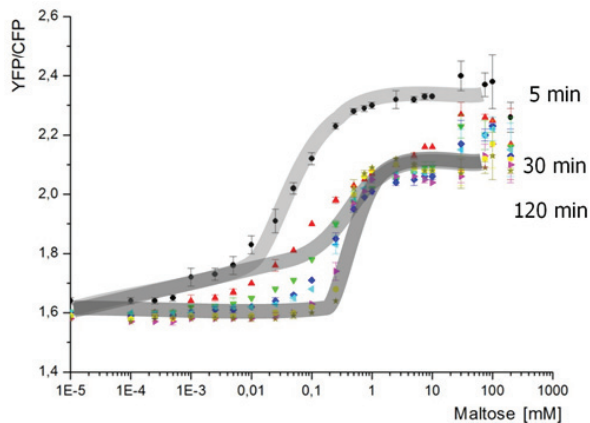


Abbildung 3-25: Zeitaufgelöste Messung des Maltosesensors in *E. coli* Rohextrakt (10 % w/vol) in 20 mM MOPS pH 7,3; 25 °C. Es ist zu erkennen, dass mit zunehmendem zeitlichem Verlauf der Messung, die Titrationskurve scheinbar zu höheren Konzentrationen verschoben wird, da die Maltose enzymatisch abgebaut wird (siehe **Abbildung 3-26**).

Abbildung 3-26 zeigt die in *E. coli* enthaltenen Komponenten für diese Reaktion und ihren Ablauf. Enzyme und Kofaktoren waren in einem kommerziellen Kit enthalten (Kapitel 5.6). Bereits nach dem ersten Schritt, nämlich der Spaltung von Maltose in zwei Glucosemoleküle, spätestens jedoch nach deren Phosphorylierung hat der Sensor keine Affinität mehr gegenüber den resultierenden

Zuckervarianten, was den Abfall der Kurven über den zeitlichen Verlauf erklärt. Die Annahme eines enzymatischen Abbaus konnte über den Anstieg in der NADPH-Konzentration photometrisch bei 340 nm bestätigt werden.

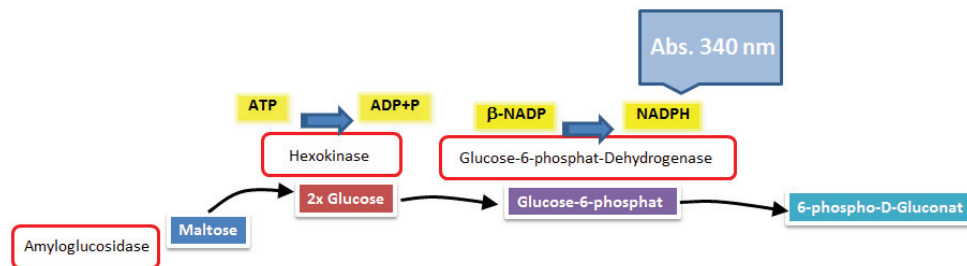


Abbildung 3-26: Enzymkaskade zum Abbau von Maltose in *E. coli* BL21 (DE3).

Fazit: Die Ergebnisse mit dem Maltosesensor in *E. coli* Rohextrakten zeigen stellvertretend für alle Sensoren, die Liganden binden, welche vom Metabolismus umgesetzt werden können, dass quantitative Messungen *in vivo* nicht möglich sind. Wenn sich die Ligandkonzentration kontinuierlich ändert, hängt das Fluoreszenzsignal vom Messzeitpunkt und von der Geschwindigkeit der Ligandenbindung bzw. -freisetzung vom Sensor ab. Da die absolute Ligandkonzentration in den Zellen nicht erfasst werden kann, sondern diese relativ über den Vergleich mit einer *in vitro* Kalibrationskurve bestimmt werden müsste, wird die reale Konzentration in den Zellen folglich falsch geschätzt.

Um das Problem des enzymatischen Abbaus beim vorliegenden Testsystem zu umgehen, wurde eine Alternative zur Analyse in Rohzelleextrakt entwickelt – die Verwendung von künstlichen Substanzen zur Imitation von *molecular crowding* (Kapitel 1.5).

3.2.7 Einfluss von *molecular crowding* auf die Affinität der Biosensoren

Nach zahlreichen Experimenten zur Charakterisierung der gereinigten Zuckersensoren unter *in vitro* Bedingungen sollte simuliert werden, welchen Einfluss *molecular crowding* auf die Affinität der Sensoren haben könnte. Dies wurde über die Veränderung des scheinbaren K_d -Werts der Sensoren quantifiziert, nachdem diese mit verschiedenen künstlichen *crowdern* gemischt wurden. Dies ist eine verbreitete Technik, um den dicht gedrängten Zustand im Zellinneren von Organismen zu imitieren.

Die Proteinkonzentration wurde konstant gehalten und die standardisierten 24 Zuckerverdünnungen zugegeben (Abbildung 5-11). Die Eigenfluoreszenz der *crowding*-Substanzen wurde unter gleichen Messbedingungen analysiert und später abgezogen. Insbesondere bovines Serumalbumin (BSA) zeigte eine starke Eigenfluoreszenz, die korrigiert werden musste.

Allgemein wird in der Literatur vor allem für Enzyme öfter beschrieben, dass deren Affinität mit steigender *crowder*-Konzentration zunimmt (Zhou, Rivas et al. 2008). Für FRET-basierte Biosensoren existieren bislang kaum Untersuchungen zu diesem Thema (Ping, Yuan et al. 2004; Bonanno and Delouise 2007; Phillip, Sherman et al. 2009).

Polyethylenglycol (PEG)

Abbildung 3-27 zeigt die Untersuchung des Glucosesensors mit unterschiedlichen Konzentrationen von Polyethylenglycol mit dem mittleren Molekulargewicht von 2.000 Da (PEG 2.000) und der Pufferkontrolle (20 mM MOPS; pH 7,3). In **Abbildung 3-27-a** ist die Verschiebung der YFP/CFP-ratio Kurve mit steigender PEG-Konzentration zu sehen. Je höher der *crowder*-Anteil, desto steiler verläuft die S-Kurve im Bereich des Wendepunkts und der K_d -Wert verschiebt sich von 0,9 mM asymptotisch zu 0,35 mM (**Abbildung 3-27-b**). Die steigenden Fehlerintervalle sind damit zu erklären, dass die Viskosität der zu pipettierenden Lösung mit erhöhter *crowder*-Konzentration erheblich zunahm, was zu einer erhöhten Varianz bei den Replikaten führte. Zudem misst man trotz Basislinienkorrektur ein immer höheres YFP/CFP-Verhältnis. Die mit der PEG-Konzentration sinkenden K_d -Werte entsprechen den bei Enzymen bereits häufig beschriebenen Affinitätssteigerungen durch *molecular crowding*.

Durch die *crowding*-Lösungen wurde diese Affinität um mehr als 38 % gesteigert. Selbst bei einer sehr geringen PEG 2.000 Konzentration von 2,5 % (w/v) sank der K_D -Wert bereits um 25 %.

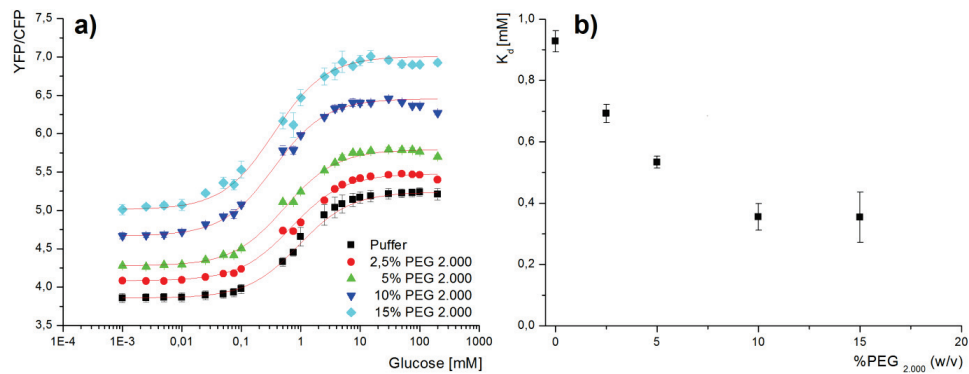


Abbildung 3-27: a) Titrationskurven des Glucosesensors in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Polyethylenglycol mit dem mittleren Molekulargewicht von 2.000 Da (2,5 - 15 % w/v) im Vergleich zur Pufferkontrolle (20 mM MOPS). Der pH wurde bei allen Ansätzen auf 7,3 eingestellt. Die Sensorkonzentration betrug 0,5 mg·mL⁻¹; b) zeigt die aus a) abgeleiteten K_D -Werte bei der jeweiligen *crowder*-Konzentration.

Für den Maltosesensor ergab das analoge Experiment ähnliche Ergebnisse. **Abbildung 3-28-a** zeigt zwar eine weniger drastische Verschiebung der S-Kurven durch steigende PEG 2.000 Konzentrationen, gleichzeitig ist jedoch auch hier gut erkennbar, dass der K_d -Wert um ca. 50 % zu niedrigeren Maltose-Konzentrationen verschoben wird (**Abbildung 3-28-b**).

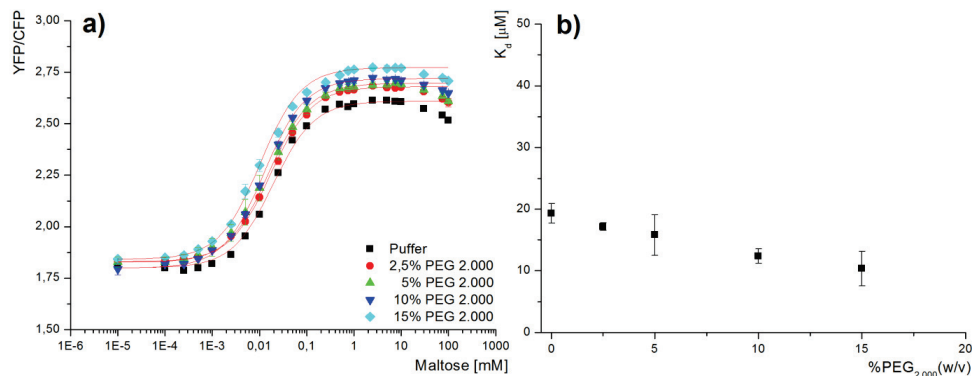


Abbildung 3-28: Titrationskurve des Maltosesensor in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Polyethylenglycol mit dem mittleren Molekulargewicht von 2.000 Da (2,5 - 15 % w/v) im Vergleich zur Pufferkontrolle (20 mM MOPS). Der pH wurde bei allen Ansätzen auf 7,3 eingestellt. Die Sensorkonzentration betrug 0,5 mg·mL⁻¹; b) zeigt die aus a) abgeleiteten K_d -Werte bei der jeweiligen *crowder*-Konzentration.

Entsprechende Untersuchungen mit längerem PEG 5.000 ergaben beim Glucosesensor ein annähernd identisches Resultat wie beim Versuch mit PEG 2.000. Auch hier verschieben sich die Titrationskurven mit steigender *crowder*-Konzentration entlang der Y-Achse auf (Abbildung 3-29-a). Der Verlauf der K_d -Werte ist ebenfalls vergleichbar. Die Affinität steigt scheinbar erneut von 0,9 mM auf etwa 0,35 mM; also um etwa 60 % (Abbildung 3-29-b).

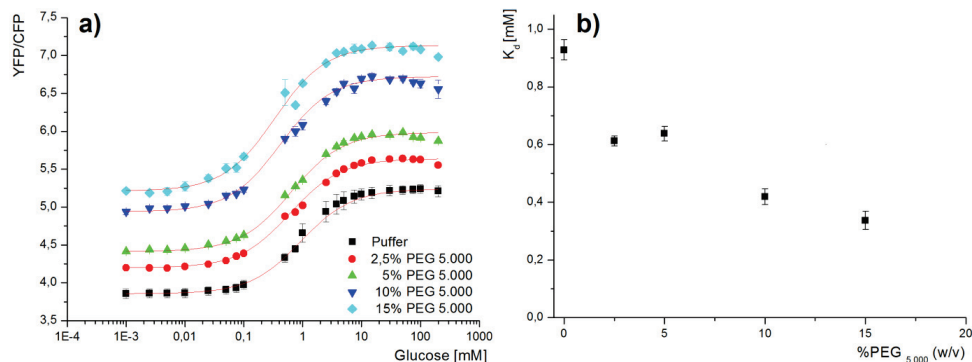


Abbildung 3-29: Der Glucosesensor mit unterschiedlichen Konzentrationen von Polyethylenglycol mit dem mittleren Molekulargewicht von 5.000 Da (2,5 - 15 %) und der Pufferkontrolle (20 mM MOPS). Der pH wurde bei allen Ansätzen auf 7,3 eingestellt. Die Proteinendkonzentration von betrug 0,5 mg·mL⁻¹; als Zuckerligand wurde Glucose in 24 Verdünnungsstufen verwendet, um von den resultierenden S-Kurven a) den K_d -Wert der jeweiligen *crowder*-Konzentration berechnen zu können b).

Demgegenüber bewirkt die Verwendung von PEG 5.000 beim Maltosesensor eine deutlichere Verschiebung der S-Kurven entlang der Y-Achse als mit PEG 2.000 (Abbildung 3-30-a). Auch bezüglich der Affinität ergibt sich aufgrund dessen eine Veränderung im Vergleich zum Versuch mit PEG 2.000. Zwar verdoppelt sich die Affinität auch hier scheinbar mit 10 % w/v PEG 5.000 (K_D = 10 μ M), jedoch sinkt die Affinität wieder (K_D = 15 μ M) in Gegenwart von 15 % w/v PEG 5.000.

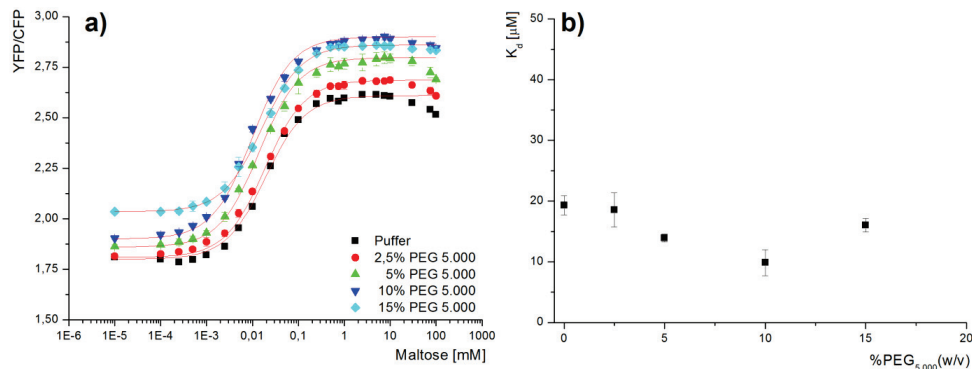


Abbildung 3-30: Der Maltosesensor mit unterschiedlichen Konzentrationen von Polyethylenglycol der mit dem mittleren Molekulargewicht von 5.000 Da (2,5 - 15 %) und der Pufferkontrolle (20 mM MOPS). Der pH wurde bei allen Ansätzen auf 7,3 eingestellt. Die Proteinendkonzentration von MP24 betrug $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; als Zuckerligand wurde Maltose in 24 Verdünnungsstufen verwendet, um von den resultierenden S-Kurven a) den K_d -Wert der jeweiligen *crowder*-Konzentration berechnen zu können b).

Aus der Literatur zu *molecular crowding* ist bekannt, dass die Affinität nicht beliebig gesteigert werden kann da der Volumenausschlusseffekt ab einer gewissen Viskosität zu sterischen Behinderungen führt, was zu einer Effekt-Umkehr bezüglich der Affinität führen kann. Daher ist es nicht überraschend, dass bei einer PEG 10.000, wie sie im folgenden Versuch eingesetzt wurde, beim Glucosesensor bis 10 % w/v zwar noch Affinitätssteigerungen von bis zu 25 % zu verzeichnen sind, sich bei 15 % *crowder*-Konzentration jedoch eine gegensätzliche Entwicklung zeigt und die Affinität nur noch um etwa 7 % relativ zur Pufferkontrolle erhöht wird (Abbildung 3-31-b).

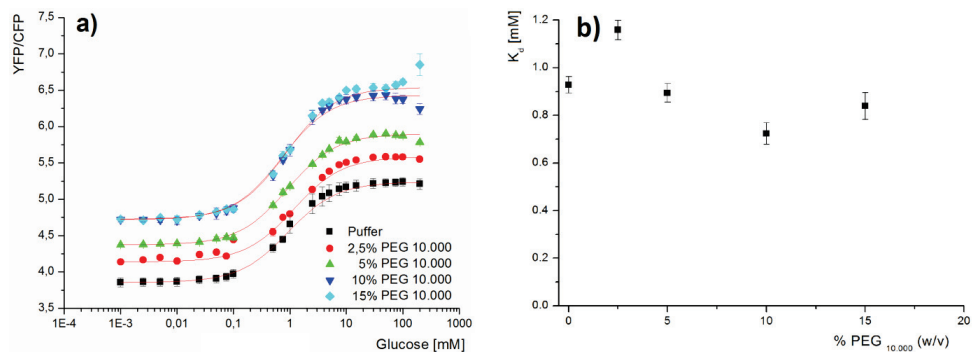


Abbildung 3-31: Der Glucosesensor mit unterschiedlichen Konzentrationen von Polyethylenglycol mit dem mittleren Molekulargewicht von 10.000 Da (2,5 - 15 %) und der Pufferkontrolle (20 mM MOPS). Der pH wurde bei allen Ansätzen auf 7,3 eingestellt. Die Proteinendkonzentration von MP18.1.1 betrug $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; als Zuckerligand wurde Glucose in 24 Verdünnungsstufen verwendet, um von den resultierenden S-Kurven a) den K_d -Wert der jeweiligen *crowder*-Konzentration berechnen zu können b).

Für den Maltosesensor nivelliert sich in Gegenwart von PEG 10.000 ebenfalls der mit den kürzeren PEG-Derivaten beobachtete scheinbare Affinitäts-steigernde *crowding*-Effekts mit steigenden *crowder* Konzentrationen (Abbildung 3-32-b).

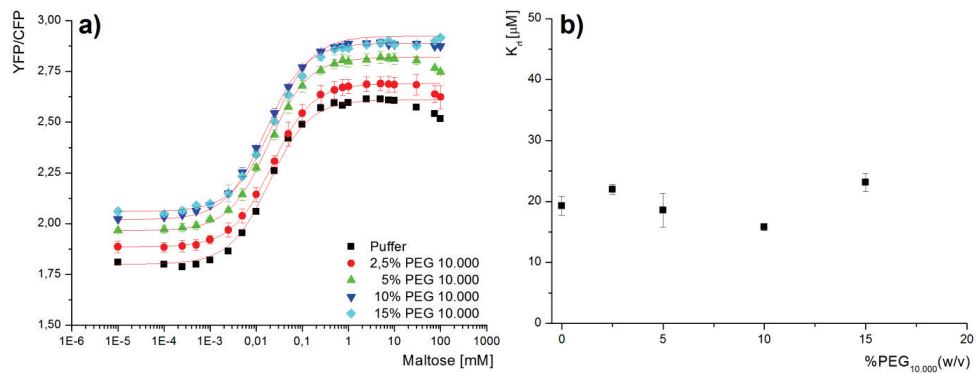


Abbildung 3-32: Der Maltosesensor MP24 mit unterschiedlichen Konzentrationen von Polyethylenglycol mit dem mittleren Molekulargewicht von 10.000 Da (2,5 - 15 %) und der Pufferkontrolle (20 mM MOPS). Der pH wurde bei allen Ansätzen auf 7,3 eingestellt. Die Proteinendkonzentration von MP24 betrug $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; als Zuckerligand wurde Maltose in 24 Verdünnungsstufen verwendet, um von den resultierenden S-Kurven a) den K_d -Wert der jeweiligen crowder-Konzentration berechnen zu können b).

Abschließend wurde PEG 20.000 als *crowder* untersucht. Beim Glucosesensor zeigen sich dieselben Tendenzen, wie mit PEG 10.000 mit einer maximalen Affinitätssteigerung von 10 %.

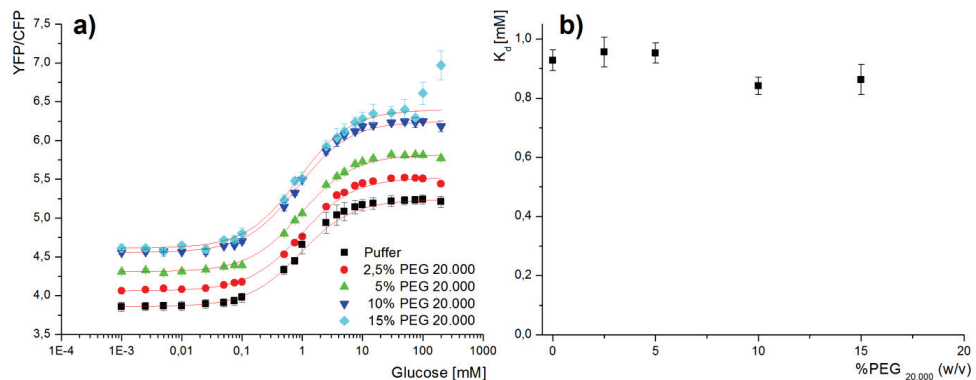


Abbildung 3-33: Der Glucosesensor MP18.1.1 mit unterschiedlichen Konzentrationen von Polyethylenglycol der mit dem mittleren Molekulargewicht von 20.000 Da (2,5 - 15 %) und der Pufferkontrolle (20 mM MOPS). Der pH wurde bei allen Ansätzen auf 7,3 eingestellt. Die Proteinendkonzentration von MP18.1.1 betrug $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; als Zuckerligand wurde Glucose in 24 Verdünnungsstufen verwendet, um von den resultierenden S-Kurven a) den K_d -Wert der jeweiligen crowder-Konzentration berechnen zu können b).

Auch der Maltosesensor zeigt in Gegenwart von PEG 20.000 Konzentrationen ein ähnliches Verhalten, wie mit PEG 10.000 **Abbildung 3-34**. Zwar suggeriert **Abbildung 3-34 b)** einen etwa 45 %igen Anstieg des K_d -Werts in Gegenwart der höchsten PEG 20.000 Konzentration, jedoch ist dies vermutlich auf eine Abweichung der Messdaten in **Abbildung 3-34 a)** von der idealen S-Kurve zurückzuführen, wodurch der K_d -Wert falsch berechnet wurde.

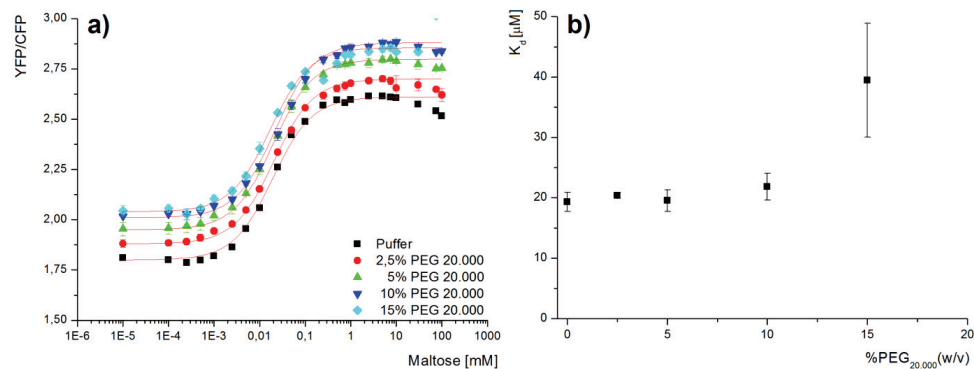


Abbildung 3-34: Der Maltosesensor MP24 mit unterschiedlichen Konzentrationen von Polyethylenglycol mit dem mittleren Molekulargewicht von 20.000 Da (2,5 - 15 %) und der Pufferkontrolle (20 mM MOPS). Der pH wurde bei allen Ansätzen auf 7,3 eingestellt. Die Proteinendkonzentration von MP24 betrug $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; als Zuckerligand wurde Maltose in 24 Verdünnungsstufen verwendet, um von den resultierenden S-Kurven a) den K_d -Wert der jeweiligen *crowder*-Konzentration berechnen zu können b).

Ficoll

Ein weiterer künstlicher *crowder* der in verschiedenen Konzentrationen getestet wurde war Ficoll, ein verzweigtes Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer mit einem Molekulargewicht von 70.000 Dalton. Es gehört ebenso wie PEG zu den am häufigsten verwendeten *crowdern* bei der Untersuchung von Enzymen (Hall and Minton 2003; Zhou, Rivas et al. 2008). **Abbildung 3-35** zeigt den Einfluss von Ficoll auf den Glucosesensor. Im Gegensatz zu den Experimenten mit PEG ist die Varianz der Ausgangsfluoreszenzverhältnisse geringer (Abbildung 3-35-a). Eine mögliche Eigenfluoreszenz der *crowding*-Lösung wurde über eine Leerprobe Basislinien-korrigiert. Die geringste Ficoll-Konzentration resultiert im Vergleich zur Pufferkontrolle bereits in einer höheren Steigung im Bereich des Kurvenwendepunkts. Dieser Effekt wird bei höheren Ficoll-Konzentrationen noch wesentlich deutlicher. **Abbildung 3-35-b** zeigt die berechneten K_d -Werte zu dieser Versuchsserie. Gut zu erkennen ist, dass die Affinität bereits durch den Einsatz von 5 % (w/v) Ficoll scheinbar nahezu verdoppelt wird. Bei einer noch höheren Ficoll-Dichte wird dieser *crowding*-Effekt wieder rückläufig und wird auf eine Affinitätssteigerung von 30 % gedämpft.

Betrachtet man hierbei lediglich den Abbildungsteil a), so wäre die rückläufige Tendenz für die Ansätze mit 10 % und 15 % Ficoll nicht auf den ersten Blick offenbar. Jedoch führen bereits diese geringen Abweichungen der Kurvenverläufe zu starken Schwankungen in der K_d -Berechnung. Dieser Versuch ist abermals ein gutes Beispiel dafür, wie enorm sensibel die Berechnung des K_d -Werts anhand der logarithmischen S-Kurven ist.

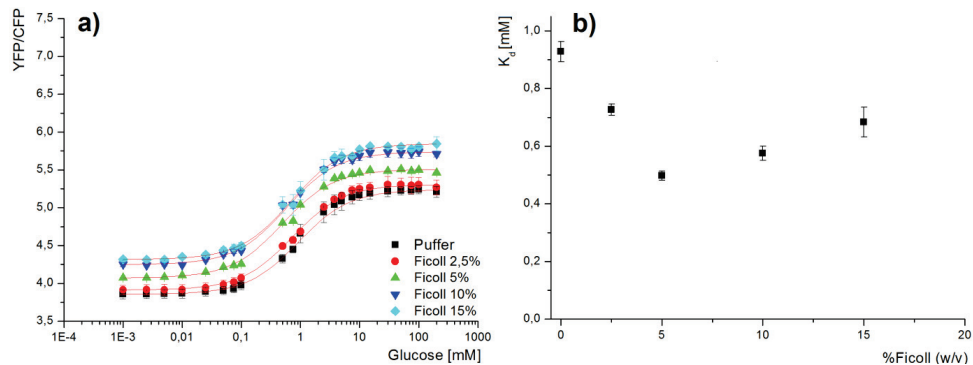


Abbildung 3-35: Der Glucosesensor MP18.1.1 mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ficoll (2,5 - 15 %) und der Pufferkontrolle (20 mM MOPS). Der pH wurde bei allen Ansätzen auf 7,3 eingestellt. Die Proteinkonzentration von MP18.1.1 betrug $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; als Zuckerligand wurde Glucose in 24 Verdünnungsstufen verwendet, um von den resultierenden S-Kurven a) den K_d -Wert der jeweiligen *crowder*-Konzentration berechnen zu können b).

Im entsprechenden Versuch mit dem Maltosesensor ergab sich ein ähnliches Resultat. Die S-Kurven liegen hier sehr nah beieinander, was die Ausgangsfluoreszenzverhältnisse betrifft (Abbildung 3-36-a). Die Tendenz, dass die höheren Ficoll-Konzentrationen zu höheren YFP/CFP-ratios im gebundenen Zustand führen, deckt sich mit den Ergebnissen des Glucosesensors. Wie auch schon bei den vorangegangenen PEG-Experimenten ist die Intensität dieser Verschiebung weniger ausgeprägt als beim Glucosesensor. Abbildung 3-36-b zeigt die entsprechenden K_d -Werte für diese Messungen. Mit 2,5 % (w/v) Ficoll ist eine scheinbare Affinitätssteigerung um 44 % zu erkennen, und zwar mit einer sehr geringen Standardabweichung. Konzentrationen von 5 – 15 % (w/v) Ficoll führen hingegen wieder zu einer Aufhebung dieses Effekts, wobei hier beachtet werden muss, dass die Abweichungen dieser berechneten Punkte vermutlich aufgrund von Pipettierfehlern bei 5 % und 15 % sehr groß ist.

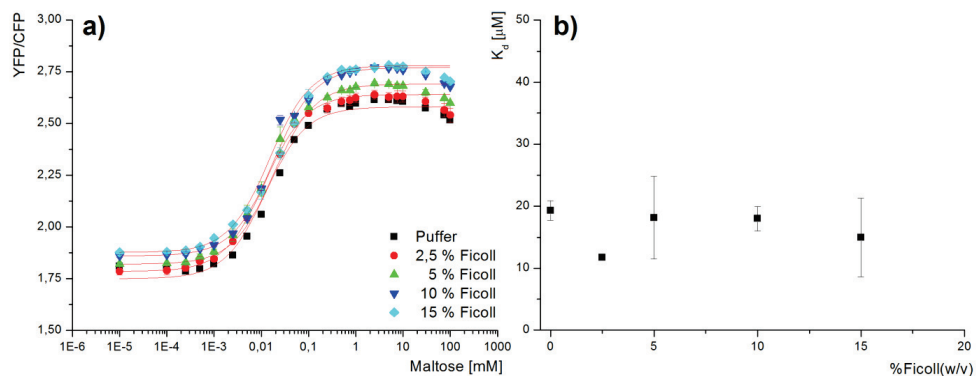


Abbildung 3-36: Der Maltosesensor MP24 mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ficoll (2,5 - 15 %) und der Pufferkontrolle (20 mM MOPS). Der pH wurde bei allen Ansätzen auf 7,3 eingestellt. Die Proteinkonzentration von MP24 betrug $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; als Zuckerligand wurde Maltose in 24 Verdünnungsstufen verwendet, um von den resultierenden S-Kurven a) den K_d -Wert der jeweiligen *crowder*-Konzentration berechnen zu können b).

Als globuläre *crowder* werden häufig Hämoglobin und bovines Serumalbumin (BSA) verwendet (Jasnin, Moulin et al. 2008). Da Hämoglobin jedoch eine rotlich-braune Eigenfärbung aufweist,

welche mit dem Fluoreszenzexperiment zu stark interferieren würde, wurde hier der Einfluss von BSA in analoger Weise getestet.

Abbildung 3-37 zeigt das Resultat der Untersuchung für den Glucosesensor. Es ist gut zu erkennen, dass im Vergleich zu den langkettigen *crowdern* ein umgekehrter Effekt bezüglich der Bindeaffinität zu verzeichnen ist, wobei die Ausgangsfluoreszenzverhältnisse sich gleichen. Die S-Kurven flachen bei 10 % und 15 % BSA deutlich ab, was sich in einem eindeutigen Affinitätsverlust von bis zu –70 % ausdrückt (**Abbildung 3-37-b**). Dieses teilweise sehr starke Abflachen der Kurven deutet eventuell auf einen Interaktion des BSA mit den Sensoren oder den Liganden hin.

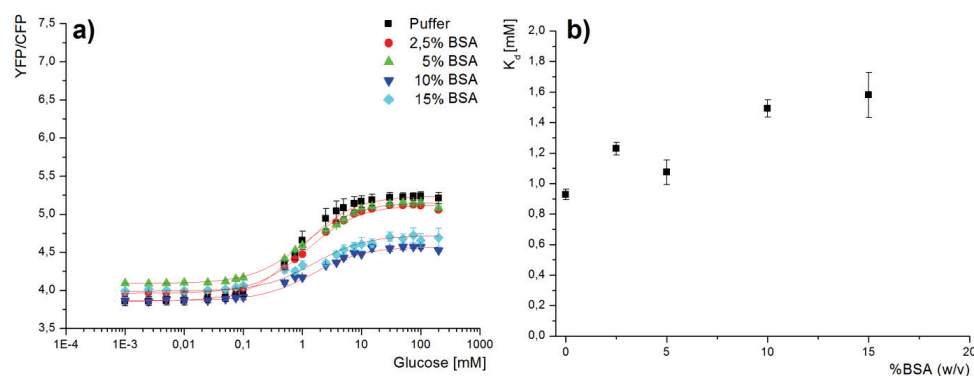


Abbildung 3-37: Der Glucosesensor MP18.1.1 mit unterschiedlichen Konzentrationen von Bovinem Serumalbumin (BSA; 2,5-15 %) und der Pufferkontrolle (20 mM MOPS). Der pH wurde bei allen Ansätzen auf 7,3 eingestellt. Die Proteinendkonzentration von MP18.1.1 betrug $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; als Zuckerligand wurde Glucose in 24 Verdünnungsstufen verwendet, um von den resultierenden S-Kurven a) den K_d -Wert der jeweiligen *crowder*-Konzentration berechnen zu können b).

Ein vergleichbarer Einfluss auf die Sensitivität des Maltosesensors bei höheren BSA-Konzentrationen konnte nicht beobachtet werden (**Abbildung 3-38-a**). Allerdings beobachtet man bei der höchsten Konzentration von 15 % BSA wieder starke Schwankungen der Messwerte, was sich sowohl im Kurvenverlauf, als auch am Fehlerbalken des K_d -Werts äußert. Abgesehen davon bestätigt sich jedoch die gleiche Tendenz, die bereits beim Glucosesensor vermutet wurde: Der Maltosesensor verliert mit steigender *crowder*-Konzentration scheinbar signifikant an Affinität. Bei einer BSA-Konzentration von 5 % verdoppelt sich bereits der K_d -Wert; bei 10 % verdreifacht sich dieser sogar.

Insgesamt führt der Einsatz dieses globulären *crowders* beim Maltosesensor zu einer scheinbaren Minderung der Affinität; ein Resultat, das für eine *in vivo* Anwendung von großem Interesse ist. Denn zwar können langkettige Moleküle Aktin-ähnliche Filamente imitieren, die auch in Prokaryoten vorkommen, jedoch kann man davon ausgehen, dass der Großteil der in *E. coli* vorkommenden Proteine eine globuläre Form haben (Han and Lee 2006), die im Cytosol mit einer Konzentration von $300\text{-}400 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ vorliegen (Zimmerman and Trach 1991). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Affinität von Biosensoren *in vivo* nicht unbedingt der *in vitro*-Kalibration entspricht.

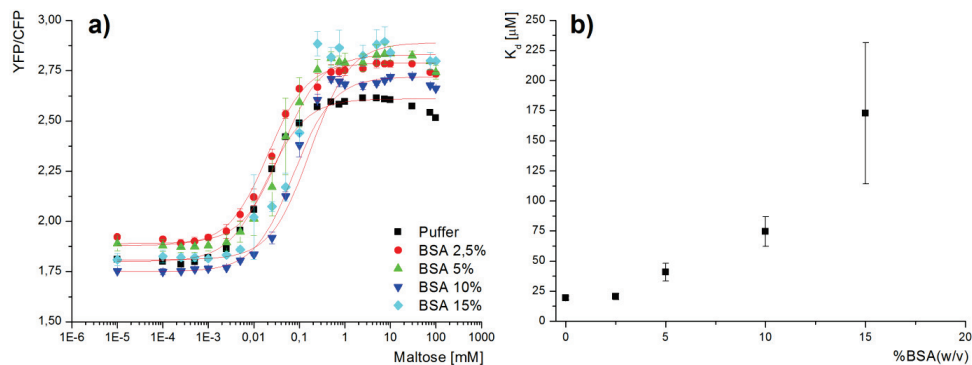


Abbildung 3-38: Der Maltosesensor MP24 mit unterschiedlichen Konzentrationen von Bovinem Serumalbumin (BSA; 2,5 - 15 %) und der Pufferkontrolle (20 mM MOPS). Der pH wurde bei allen Ansätzen auf 7,3 eingestellt. Die Proteinendkonzentration von MP24 betrug $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; als Zuckerligand wurde Maltose in 24 Verdünnungsstufen verwendet, um von den resultierenden S-Kurven a) den K_d -Wert der jeweiligen crowder-Konzentration berechnen zu können b).

Fazit: Für *in vivo* Studien sind die Ergebnisse mit verschiedenen *crowdern* sehr wichtig, da intrazellulär nachweislich ein sehr dicht gepackter Zustand herrscht (Kapitel 1.5). Die übliche *in vitro*-Kalibration mit ausgesprochen verdünnten Proteinkonzentrationen erscheint vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse abermals ungeeignet. Dabei muss jedoch auch berücksichtigt werden, dass die Veränderung der K_d -Werte nicht ausschließlich auf die Bindedomänen zurückgeführt werden kann. Es lässt sich ebenfalls eine Interaktion mit den Fluoreszenzproteinen annehmen, da in vielen Fällen bereits die Ausgangs-FRET-Verhältnisse stark von der Pufferkontrolle abweichen, obwohl die Eigenfluoreszenz der *crowder* bereits herausgerechnet wurde.

Da sich die Anfälligkeit der FRET-basierten Biosensoren in einigen der vorgestellten Ergebnisse auf die Donor- und Akzeptormoleküle zurückführen ließ, wurde nach Alternativen zu den vorwiegend verwendeten GFP-Proteinen gesucht. Es kann davon ausgegangen werden, dass andere verfügbare GFP-Varianten keine signifikante Verbesserung hinsichtlich der Sensitivität auf Umgebungseinflüsse bieten, da es sich bei Proteinen wie Citrine bereits um eine Variante handelt, die besonders stabil sein soll (Griesbeck, Baird et al. 2001). Daher erschien es sinnvoll, nicht GFP-basierte Fluoreszenzproteine hinsichtlich ihrer Sensitivität auf Umgebungsbedingungen zu untersuchen.

3.2.8 EcFbFP als alternativer FRET-Donor

Eine vielversprechende Alternative, die GFP in vielen Punkten übertreffen soll, ist das Flavin-mononucleotid (FMN)-basierte Fluoreszenzprotein (FbFP) (Drepper, Huber et al. 2010). Diese Blaulichtrezeptoren der LOV (Light-Oxygen-Voltage)-Familie sind in Pflanzen und Bakterien weit verbreitet. Ein Vorteil dieser Proteine ist unter anderem die Sauerstoff-unabhängige Reifung (Drepper, Eggert et al. 2007). Nachteilig sind vor allem der geringe Extinktionskoeffizient (ϵ) des FMNs von $12.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und die Quantenausbeute (QY) von 0,26. Im Vergleich dazu weist ECFP einen Wert von $\epsilon=32.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und einen QY = 0,4 auf. Darüber hinaus sind FbFPs aufgrund ihrer FMN-Abhängigkeit nur als blaue Fluoreszenzproteine erhältlich. Da dieses Chromophor nicht mit dem restlichen Protein exprimiert wird, sondern in der Zelle als Kofaktor vorliegen muss, kann man ihn

nicht molekular manipulieren, um Farbvarianten zu erhalten, wie es beim Chromophor von GFP gemacht wurde.

Um Erkenntnisse über die Sensitivität von (FMN)-basierten Fluoreszenzproteinen gegenüber den Umgebungsbedingungen zu erhalten, wurde von der Arbeitsgruppe Drepper des Instituts für molekulare Enzymtechnologie (IMET) der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf eine FbFP-Variante aus *E. coli* (EcFbFP) für eine Vergleichsstudie mit dem Donorprotein ECFP bereitgestellt. Die Kultivierung und Reinigung wurde analog zu den GFP-Derivaten vorgenommen (Kapitel 5.5). **Abbildung 3-39** zeigt vergleichend die gereinigten Proteine EcFbFP und ECFP. EcFbFP hat nur etwa die Hälfte des Molekulargewichts eines GFP-Moleküls, was sich im Kontext von Fluoreszenzmarkern bei funktionalen Proteinen aufgrund verringerter sterischer Wechselwirkungen als Vorteil erweisen kann.

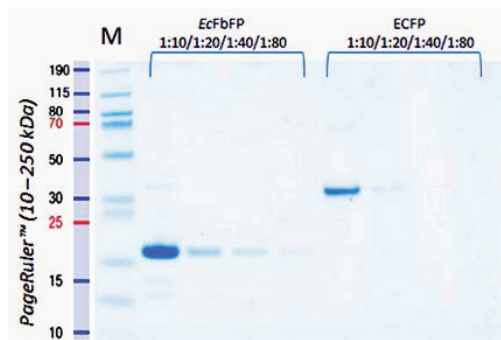


Abbildung 3-39: SDS-Gel nach Affinitätschromatografischer Reinigung von EcFbFP (16,5 kDa) und ECFP (30 kDa) (Kapitel 5.6). Die Proben wurden entsprechend der Standardanleitung von invitrogen vorbereitet und auf ein 4-12% Bis-Tris Gel aufgetragen. Der Längenmarker deckte einen Bereich von 10-250 kDa ab.

pH-Einfluss

Abbildung 3-40 zeigt die pH-Abhängigkeit der beiden blau-fluoreszierenden Proteine ECFP und FbFP. Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, zeigt ECFP eine starke pH-Abhängigkeit und verliert mit sinkendem pH im Bereich von pH 6,3 -8,3 stark an Fluoreszenzintensität. Dem gegenüber zeigen sich bei EcFbFP keinerlei signifikante Einflüsse auf die Fluoreszenz im untersuchten pH-Bereich (**Abbildung 3-40-b**). Dies stellt bereits eine erhebliche Verbesserung gegenüber GFP-basierten Fluoreszenzproteinen dar, wenn man berücksichtigt, dass der intrazelluläre pH-Wert innerhalb der untersuchten Parameter schwanken kann.

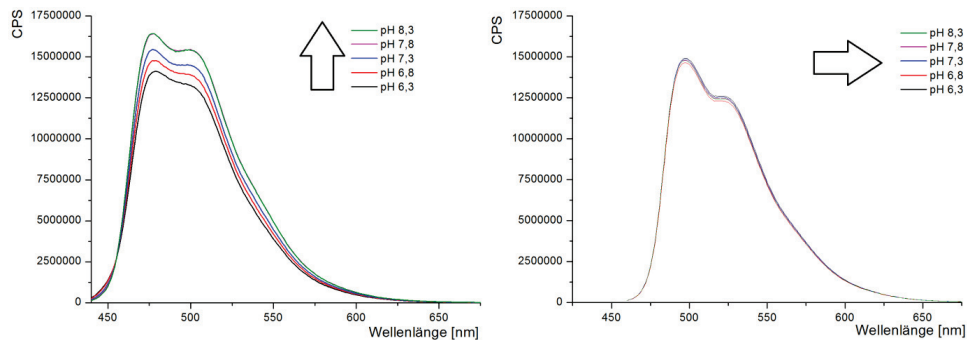


Abbildung 3-40: Fluoreszenzemissionsspektren der Donorproteine ECFP a) und EcFbFP b) bei verschiedenen pH-Werten in 20 mM MOPS Puffern. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug jeweils $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ in 20 mM MOPS Puffer; 25°C . Anregung EcFbFP 450 nm, ECFP 428 nm.

Einfluss der Ionenstärke

Auch bezüglich der Variation der Ionenstärke mit verschiedenen MOPS-Puffer Konzentrationen erweist sich EcFbFP als weniger anfällig (**Abbildung 3-41**).

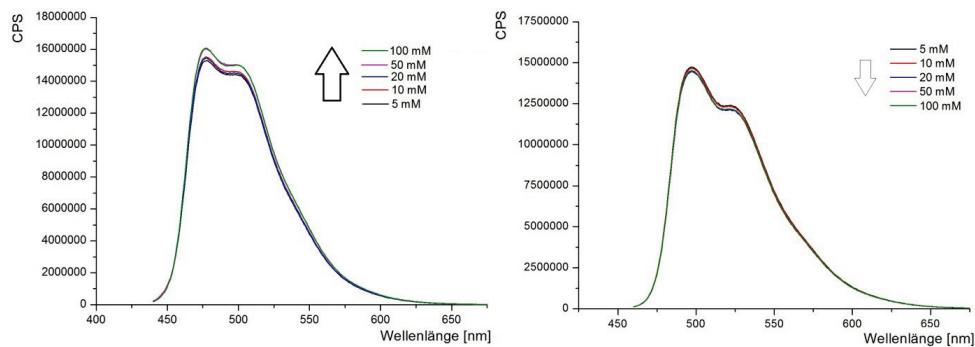


Abbildung 3-41: Fluoreszenzemissionsspektren der Donorproteine ECFP a) und EcFbFP b) in verschieden konzentrierten MOPS Puffern. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug jeweils $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ in 20 mM MOPS Puffer; 25°C . Anregung EcFbFP 450 nm, ECFP 428 nm.

Einfluss von Salzen

Analog zu den in Kapitel 3.2.4 durchgeführten Untersuchungen wurde EcFbFP auf dessen Sensitivität gegenüber verschiedenen Salzen untersucht. Die Ergebnisse in **Abbildung 3-42** zeigen auch hier die geringere Empfindlichkeit des EcFbFPs im Vergleich zum ECFP. Wie schon in Kapitel 3.2.3 diskutiert wurde, zeigt sich für ECFP nur bei Natriumphosphat eine Abnahme in der Fluoreszenz ($>10 \text{ mM}$). Die übrigen Schwankungen, wie der leichte Anstieg mancher Datenpunkte in den höchsten Konzentrationsbereichen sind auf die Pipettierungenauigkeiten und die Einfachbestimmung zurückzuführen. EcFbFP hingegen zeigt eine noch geringere Abweichung in seiner Fluoreszenzintensität bei Anwesenheit der verschiedenen Salze. Insgesamt wären hinsichtlich dieses Einflussfaktors die beiden Donorproteine vergleichbar, mit Ausnahme der Anfälligkeit auf hohe Konzentrationen Natriumphosphat beim ECFP.

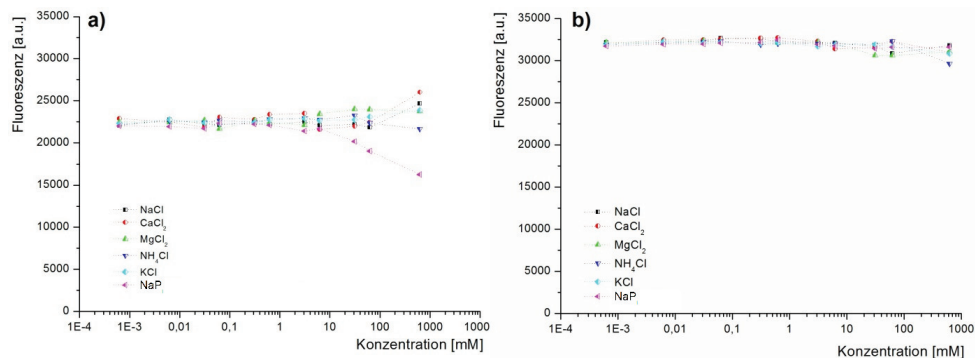


Abbildung 3-42: Einfluss verschiedener Konzentrationen der Salze NaCl, CaCl₂, MgCl₂, KCl, NH₄Cl, MnCl₂, und NaPi auf die Fluoreszenzemission der Donorproteine a) ECFP (0,25 mg·mL⁻¹) und b) EcFbFP (0,5 mg·mL⁻¹) in 20 mM MOPS Puffer; 25 °C. EcFbFP ex:450 nm/em:495 nm, ECFP ex:428 nm/ em:485 nm.

Einfluss von Metaboliten

Absolut vergleichbar hingegen ist die Sensitivität gegenüber den Adenosin-Phosphaten AMP, ADP und ATP. **Abbildung 3-43** zeigt für beide Proteine keinen Einfluss von AMP und ADP. Bei ATP mit Konzentrationen >10 mM zeigen sowohl ECFP als auch EcFbFP eine Verringerung der Fluoreszenzintensität (~15 %). Die physiologische Konzentration von ATP in *E. coli* liegt laut Literatur etwa bei diesem Grenzwert (Bennett, Kimball et al. 2009).

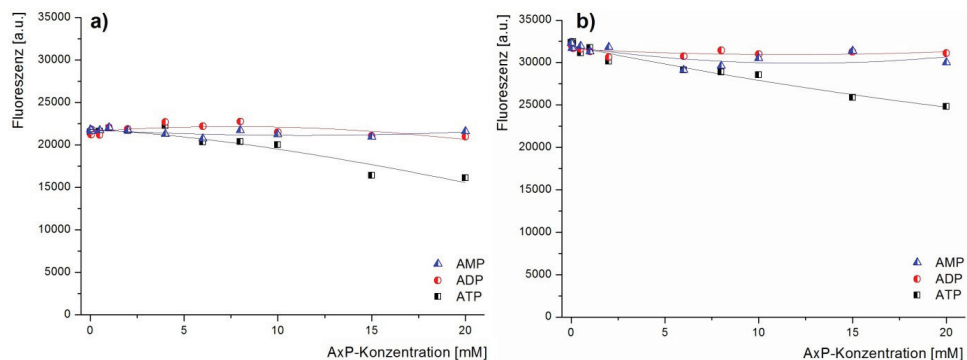


Abbildung 3-43: Einfluss verschiedener Konzentrationen von AMP, ADP und ATP auf die Fluoreszenzemission der Donorproteine a) ECFP (0,25 mg·mL⁻¹) und b) EcFbFP (0,5 mg·mL⁻¹) in 20 mM MOPS Puffer; 25 °C. EcFbFP ex:450 nm/em:495 nm, ECFP ex:428 nm/ em:485 nm.

Wesentlich verschieden dagegen ist der Einfluss der Nicotinamadenindinukleotide NAD⁺, NADP⁺, NADH und NADPH. Zeigt sich bei ECFP konzentrationsabhängig für alle Substanzen eine große Varianz in der Fluoreszenzemission, die sowohl zur Intensivierung (NADP⁺, NADH, NADPH), als auch zur Abnahme in der Emission (NAD⁺) führen kann, so ist EcFbFP wesentlich unempfindlicher mit Abweichungen unter 12 % (**Abbildung 3-44**).

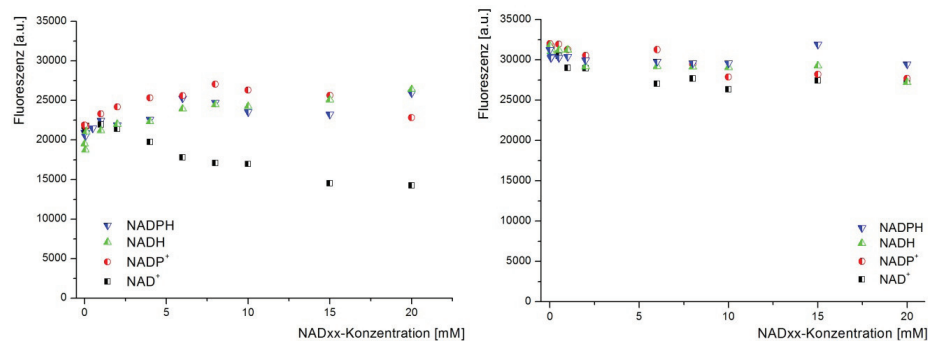


Abbildung 3-44: Einfluss verschiedener Konzentrationen der Kofaktoren NAD^+ , NADP^+ , NADH und NADPH auf die Fluoreszenzemission der Donorproteine a) ECFP ($0,25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) und b) EcFbFP ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) in 20 mM MOPS Puffer; 25 °C. EcFbFP ex:450 nm/em:495 nm, ECFP ex:428 nm/ em:485 nm.

Der Einfluss von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) und Guanosintriphosphat (GTP) wurde, wie im Kapitel 3.2.5 beschrieben, auch für EcFbFP getestet. **Abbildung 3-45-b** zeigt abermals, wie gering die Abweichung über die Verdünnungsreihe der Guanosinphosphate bei EcFbFP ist. Hier war absolut kein Einfluss festzustellen, während ECFP nur einen leichten Anstieg in der Fluoreszenzintensität.

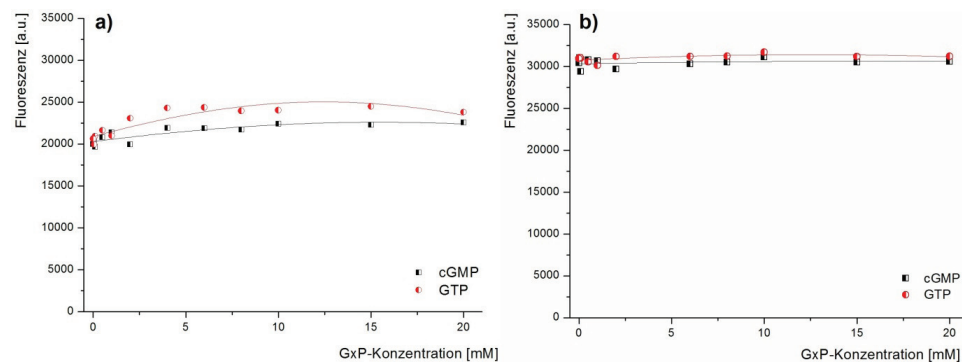


Abbildung 3-45: Einfluss verschiedener Konzentrationen der Kofaktoren cGMP und GTP auf die Fluoreszenzemission der Donorproteine a) ECFP ($0,25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) und b) EcFbFP ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) in 20 mM MOPS Puffer; 25 °C. EcFbFP ex:450 nm/em:495 nm, ECFP ex:428 nm/ em:485 nm.

Fazit: Gegenüber vielen der gezeigten Parameter weist EcFbFP eine geringere Sensitivität auf. Angefangen beim pH-Wert, über die Ionenstärke, bis hin zu diversen Zellmetaboliten und Salzen. Insgesamt sind die Abweichungen stets maximal genauso hoch wie bei ECFP, meist aber geringer.

3.2.9 Neue Sensorkonstrukte

Da die in den vorherigen Versuchen gezeigte geringere Empfindlichkeit des isolierten EcFbFPs gegenüber Umgebungseinflüssen zeigten, sollte dieses Fluoreszenzprotein alternativ zum ECFP als Donor im Glucose- und Maltosesensor erprobt werden. Die Klonierung der Sensorkonstrukte erfolgte in der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Drepper am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der

Universität Düsseldorf. Im Rahmen dieses Promotionsprojekts konnte nur der Glucosensor fertig gestellt werden.

Abbildung 3-46 zeigt das Emissionsspektrum des gereinigten neuen FbFB/Citrine-basierten Glucosensors bei einer Anregungswellenlänge von 450 nm. Gut zu erkennen sind die Emissionsmaxima der Fluoreszenzproteine *EcFbFP* (blau) und Citrine (gelb). Bereits aus dieser Grafik geht hervor, dass bereits in Abwesenheit von Glucose ein sehr starker FRET stattfindet, da sonst keine derart ausgeprägte gelbe Fluoreszenzemission gemessen werden könnte.

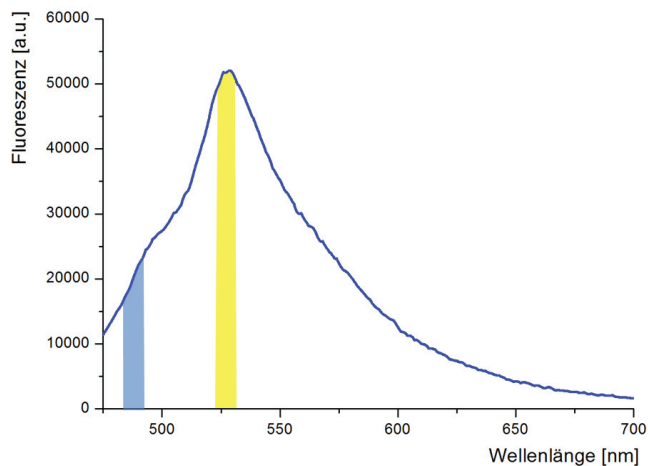


Abbildung 3-46: Emissionsspektrum des gereinigten *EcFbFP/Citrine*-Glucosensors nach Anregung bei 450 nm. Das Emissionsmaximum von Citrine ist gelb hervorgehoben, das von *EcFbFP* in blau. Die Proteinkonzentration betrug 0,5 mg·mL⁻¹ in 20 mM MOPS pH 7,3; 25 °C.

Genau dieser sehr starke Ausgangs-FRET erweist sich jedoch als Problem. Denn bei Zugabe von Glucose resultiert keine erkennbare Änderung des YFP/*EcFbFP*-Verhältnisses mehr (**Abbildung 3-47**).

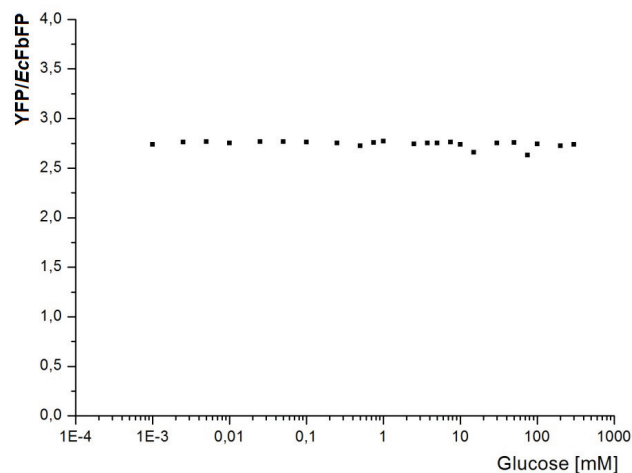


Abbildung 3-47: Titrationskurve des neuen *EcFbFP* -Glucosensors. Die Proteinkonzentration betrug 0,5 mg·mL⁻¹ in 20 mM MOPS pH 7,3; 25 °C. *EcFbFP* ex:450nm/em:495nm; Citrine ex:450nm/em:528 nm.

Die scheinbar fehlende Sensitivität des Biosensors gegenüber Glucose kann viele Ursachen haben. Denkbar sind z.B.:

- Eine sterische Behinderung der Bindedomäne durch das neue Fluoreszenzprotein (*EcFbFP*).
- Eine bereits zu große räumliche Nähe von Donor (*EcFbFP*) und Akzeptor (Citrine), die durch die Bindung der Glucose nicht mehr verändert wird.

In Kooperation mit Dr. Thomas Gensch vom Institut für Komplexe Systeme 4 des Forschungszentrums Jülich wurden Fluoreszenzlebensdauer-Messungen des FRET-Donors *EcFbFP* durchgeführt, um die Ursache für das beobachtete Phänomen genauer zu beleuchten. Dabei zeigt eine Änderung der Fluoreszenzlebensdauer nach Zugabe des Liganden (hier: Glucose) an, dass es Bindungs-bedingt zu einer Konformationsänderung des Sensors kommt und mehr oder weniger Energie auf den Akzeptor (hier: Citrine) übertragen wird.

Die Untersuchungen ergaben geringfügige Änderung der Fluoreszenzlebensdauer des *EcFbFP*s, was auf einen erhöhten FRET in Gegenwart von Glucose hinweist (**Abbildung 3-48**). Daher kann angenommen werden, dass weder die Bindedomäne sterisch blockiert, noch die Sensorgeometrie insgesamt prinzipiell ungünstig für einen funktionalen Sensor ist. Die Ergebnisse können vielmehr als Hinweis darauf betrachtet werden, dass die FRET-Partner sich *á priori* bereits bei nicht besetzter Bindedomäne zu nahe beieinander liegen und die Bindungs-bedingte Konformationsänderung daher keine signifikante Steigerung des FRET-Effekts mehr bewirkt. Der Einbau von Peptidsequenzen als *spacer* könnte hier Abhilfe schaffen.

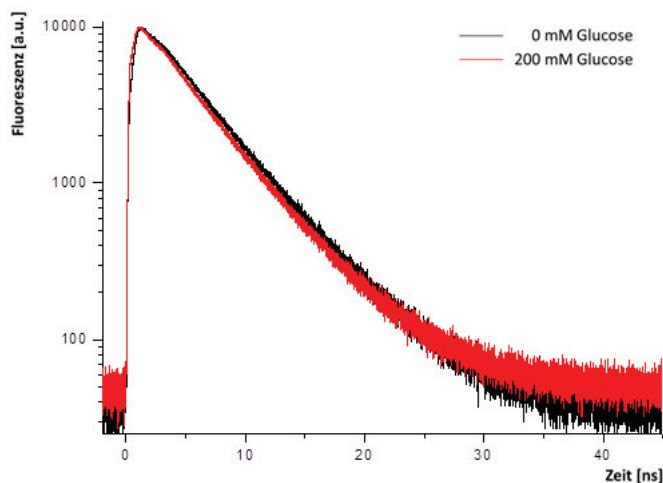


Abbildung 3-48: Fluoreszenzlebensdauer Messung des Sensorkonstrukts MP18.1.1_ *EcFbFP*. Die Messung erfolgte in An- und Abwesenheit von Glucose. Nach Zuckerzugabe ist eine leichte Abnahme der Donorlebensdauer zu beobachten (rot), was einen FRET zwischen *EcFbFP* und Citrine beweist.

Auf der Basis dieser Informationen werden in einer nachfolgenden Dissertation neue FRET-basierten Biosensoren mit *EcFbFP* konstruiert werden.

3.2.10 Photophysikalische Beobachtungen

Da die untersuchten FRET-basierten Biosensoren nicht selbst entwickelt wurden, ist es für eine Weiterentwicklung solcher Systeme notwendig tiefere Einblicke über die molekulare Funktionsweise zu gewinnen. Denn es existieren bislang keine Kristallstrukturen dieser Biosensoren, sodass elementare Informationen nicht verfügbar sind; beispielsweise wie sich die Quartärstruktur der Sensoren durch die Zuckerbindung ändert. Um nähere Erkenntnisse über die Wechselwirkungen der drei Domänen in diesen Biosensoren zu erhalten, wurden auch mit dem Glucose- und dem Maltosesensor Fluoreszenzlebensdauer Messungen durchgeführt. Durch einen Kooperationspartner, war es möglich die Fluoreszenzlebensdauer der FRET-Partnermoleküle zu untersuchen, was für eine Charakterisierung eines Sensorsystems von großem Interesse ist, da man mit Nanosekunden-Auflösung die Relaxierung der FRET-Partner nach Anregung dokumentieren kann (vgl. Kapitel 1.1.2).

Es wurden zunächst Emissionsspektren nach Anregung bei 428 nm aufgenommen, sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Glucose bzw. Maltose. Hierbei kann man für den Glucosesensor eine Abnahme der Donoremission von etwa 20,5 % feststellen; beim Maltosesensor sind es 18,5 % (**Abbildung 3-49**).

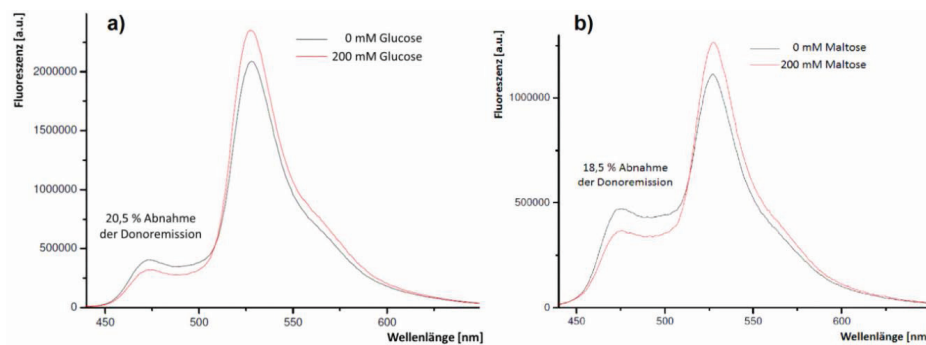


Abbildung 3-49: Emissionsspektren a) des Glucosesensors und b) des Maltosesensors in An- und Abwesenheit der Zuckerliganden. (Grafiken von Dr. Gensch, ICS-4). Die Proteinkonzentration betrug $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ in 20 mM MOPS pH 7,3; 25 °C.

Der Betrag dieser Abnahme sollte mit der Lebensdaueränderung des Donorproteins nach Anregung korrelieren, wenn es sich wie vermutet photophysikalisch um FRET handelt. **Abbildung 3-50** zeigt die entsprechende Fluoreszenzlebensdauer Messung für den Maltosesensor. Es ist gut zu erkennen, dass die Lebensdauer von ECFP nach Zugabe von Maltose signifikant abfällt (rot). Dr. Gensch berechnete die Abnahme der Lebensdauer mit 16 %, was mit den Beobachtungen aus dem Spektrum **Abbildung 3-49-b** korreliert. Als Konsequenz dieser Beobachtung kann folglich angenommen werden, dass es sich beim Maltosesensor und dessen Spektrungsveränderung nach Zuckerbindung photophysikalisch tatsächlich um FRET handelt.

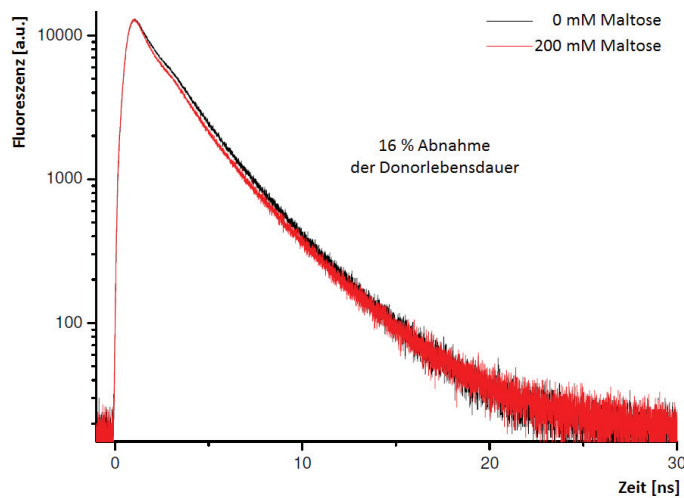


Abbildung 3-50: Fluoreszenzlebensdauer Messung des Donorproteins (ECFP) als Teil des Maltosesensors (nicht als isoliertes Protein!). Die Messung erfolgte in An- und Abwesenheit von Maltose. Die Proteinkonzentration betrug 0,5 mg·mL⁻¹ in 20 mM MOPS pH 7,3; 25 °C.

Die Fluoreszenzlebensdauer Messungen des Glucosesensors lieferte hingegen unerwartete Ergebnisse. Hier wurde nach Zugabe des Zuckers eine Zunahme in der Donorlebensdauer von 11 % gefunden. Das Experiment wurde mit demselben Ergebnis mehrfach wiederholt. Dies steht im Gegensatz zu den Fluoreszenzemissionsspektren in **Abbildung 3-49-a**, welche eine Abnahme der Donoremission von 20,5 % zeigten.

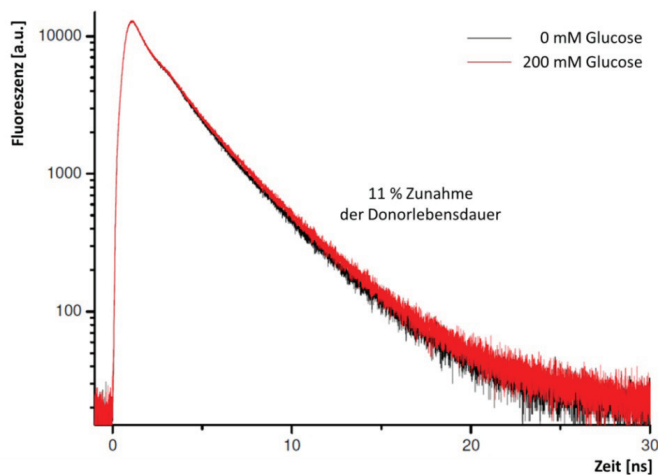


Abbildung 3-51: Fluoreszenzlebensdauer Messung des Donorproteins (ECFP) als Teil des Glucosesensors (nicht als isoliertes Protein!). Die Messung erfolgte in An- und Abwesenheit von Glucose. Die Proteinkonzentration betrug 0,5 mg·mL⁻¹ in 20 mM MOPS pH 7,3; 25 °C.

Eine Erklärung für diese Beobachtung ergibt sich möglicherweise aus dem Aufbau des Glucosesensors. Wie in **Abbildung 1-16** beschrieben, wurde bei diesem Sensor das Donorprotein (ECFP) in die

Bindedomäne des Biosensors integriert, wohingegen es beim Maltosesensor N-terminal an das Bindeprotein fusioniert wurde. Es wurde vermutet, dass hierdurch ECFP weniger Freiheitsgrade hat und die rigidere Struktur zu einem sehr viel effizienteren FRET Ereignis führt, folglich weitaus schneller stattfindet, und daher mit der am ICS-4 vorhandenen Messtechnik nicht erfasst werden kann.

Da die Apparatur von Dr. Gensch nur im Nanosekundenbereich messen kann, wurden weitere Messungen bei Dr. Eduard Fron von der Katholischen Universität in Leuven durchgeführt, wo Fluoreszenzlebensdauer Messungen im Femto- bis Picosekundenbereich aufgelöst werden können. Fände also ein schnelleres FRET-Ereignis statt, wie vermutet wurde, so sollte man es hierdurch auflösen können. Anschließend wurden der Glucose- und der Maltosesensor sowie die isolierten Fluoreszenzproteine ECFP, EYFP und Citrine durch Dr. Fron vermessen. Die Messung ist ausgesprochen komplex und besteht, sehr allgemein formuliert, aus einem sehr starken Anregungslaser, dessen Lichtimpulse durch Dutzende konfokale Spiegel, Linsen und Blenden (**Abbildung 3-52-b**) zu einer Durchflussküvette (**Abbildung 3-52-a**) geleitet wird. Die Durchflussküvette soll Bleicheffekten des starken Lasers entgegenwirken. Die Detektoren verfügen über Photomultiplier.

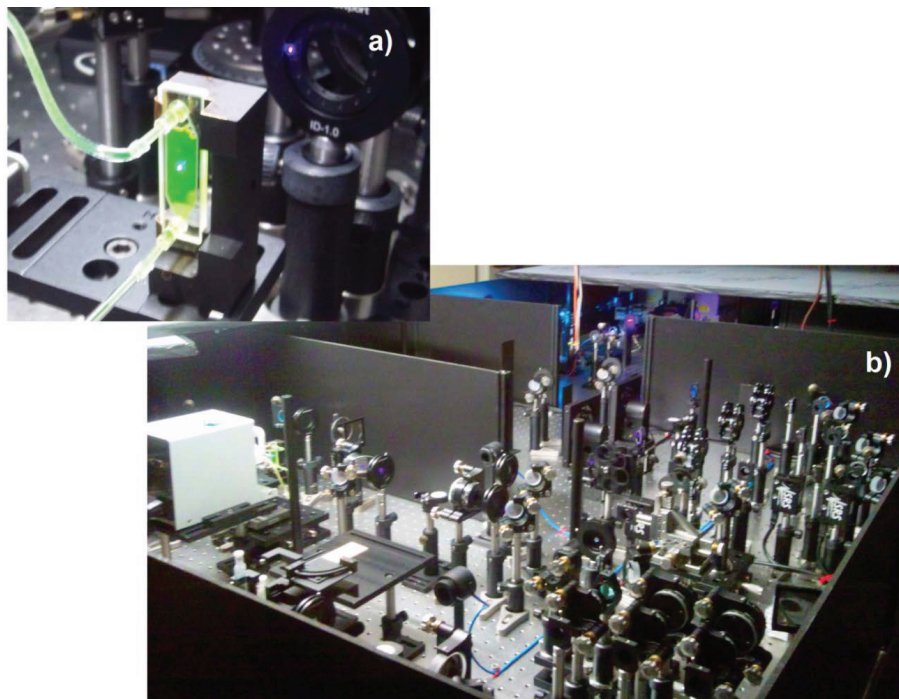


Abbildung 3-52: Apparatur für Fluoreszenzlebensdauer Messungen im Femtosekunden-Maßstab von Dr. Eduard Fron, KU Leuven.

Die aus diesen Messungen erhaltenen Ergebnisse bestätigen, dass beim Glucosesensor ein signifikant schnelleres FRET-Ereignis stattfindet als beim Maltosesensor. **Abbildung 3-53** zeigt einen Auszug dieser Experimente.

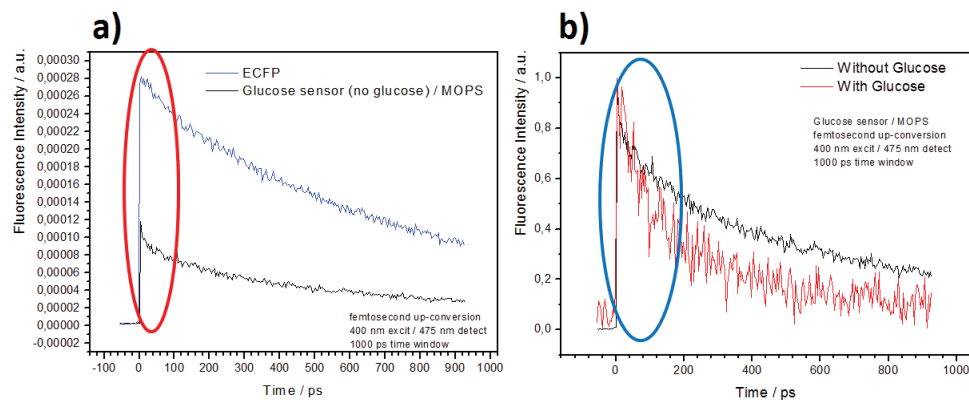


Abbildung 3-53: Fluoreszenzlebensdauer Messungen des Glucosesensors in einer Zeitauflösung bis 1000 Picosekunden. a) zeigt zum einen die Abklingzeiten des isolierten Donorproteins ECFP (blaue Kurve) und darüber hinaus ECFP als integrierten Teil des Glucosesensors (schwarze Kurve). b) zeigt die Messung des Donors ECFP als Teil des Glucosesensors in An- und Abwesenheit von Zuckerliganden. Die Anregung erfolgte bei 400 nm, um den Akzeptor (Citrine) keinesfalls anzuregen. Aus a) lässt sich einwandfrei entnehmen, dass ein großer Teil des Fluoreszenzabfalls des Donors in diesem ps-Zeitfenster geschieht (rote Hervorhebung). b) weist klar nach, dass nach Zuckerzugabe dieser Abfall durch FRET beschleunigt wird (blaue Hervorhebung). (Grafiken: Dr. Fron, KU Leuven).

Zu erkennen ist hier, dass in Anwesenheit von Glucose die Lebensdaueränderung des ECFPs in einem schnellen Messzeitfenster von unter 500 Picosekunden abfällt (**Abbildung 3-53-b**). Die zuvor dargelegte Beobachtung (**Abbildung 3-51**) könnte somit auf die Integration des Donors in die Bindedomäne zurückzuführen sein, da der FRET nachgewiesener Maßen schneller als beim Maltosesensor. Dieser wurde ebenfalls in Leuven analysiert und zeigt in diesem Zeitfenster nur einen Teil seiner Lebensdauerabnahme.

Fazit: Die Ergebnisse der Lebenszeitmessungen deuten darauf hin, dass die bei beiden Sensoren beobachteten Unterschiede auf deren unterschiedlichen Aufbau zurückzuführen sind (**Abbildung 1-16**). Um die Annahme zu stützen, dass die Integration des Donorproteins zum schnelleren FRET führt, müssten Folgeexperimente vollzogen werden. Es wäre hierbei vor allen Dingen notwendig die dreidimensionalen Strukturen der Sensoren zu kennen, um räumlich interpretieren zu können, wie sich die Integration des Donors in die Bindedomäne tatsächlich auswirkt. Würde es gelingen, den beobachteten schnelleren FRET auf die Integration des Donors zurückzuführen, wäre diese Information für die Konstruktion weiterer Sensoren hochinteressant, da sich daraus eine Möglichkeit der Effizienzsteigerung des FRET-Phänomens ergibt.

4 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Die in Kapitel 3.2 diskutierten Ergebnisse werfen fast ausnahmslos ein kritisches Licht auf die untersuchten FRET-basierten Biosensoren; vor allem im Hinblick auf deren Verwendung als Werkzeuge für die quantitative Metabolitanalytik *in vivo*. Hierfür sind die Sensoren nachweislich nicht geeignet, da sie bezüglich ihrer Signalintensität eine hohe Anfälligkeit gegenüber einer Vielzahl von intrazellulären Substanzen und eine starke Sensitivität bei der Variation von Umgebungsbedingungen aufweisen.

So führen bereits moderate Veränderungen des pH-Werts (pH 6,3-8,3) bei beiden Sensoren zu starken Veränderungen des FRET-Signals, die als Konsequenz sogar eine modifizierte Affinität der Bindedomänen suggerieren (**Abbildung 3-4**). Die Analyse der isoliert exprimierten Fluoreszenzproteine wies nach, dass die GFP-Derivate massiv durch die pH-Verschiebung in ihrer Emissionsintensität beeinflusst werden (**Abbildung 3-5** und **Abbildung 3-6**), was einen Teil der beobachteten Effekte erklären kann. Allerdings kann auch die Bindedomäne selbst in ihrer Affinität durch die Umgebungsbedingungen beeinflusst werden, was messtechnisch nur schwer nachweisbar ist; vor allem da die Bindeproteine im Gegensatz zu Enzymen keine Reaktion katalysieren, die direkt verfolgt werden kann.

Ähnlich sensitiv zeigen sich beide Sensoren gegenüber Veränderungen ihres ionischen Milieus. Sowohl die Variation der Ionenstärke des MOPS Puffers (**Abbildung 3-7** bis **Abbildung 3-9**) als auch der Zusatz verschiedener Salze führte zu signifikanten Veränderungen der FRET-Verhältnisse. Bei Letzterem zeigte sich der besonders interessante Effekt, dass Calcium- Magnesium- und Manganchlorid in Konzentrationen von 2-5 mM zu einer ausgeprägten Steigerung des FRET-Verhältnisses führen; zusätzlich zu dem durch Bindung der Zuckerliganden bedingten Anstieg (**Abbildung 3-11** bis **Abbildung 3-14**). Im Falle des Glucosesensors kann dies mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einem Calcium-Bindemotiv in der Glucose-Bindedomäne erklärt werden, was zu einer Konformationsänderung der Bindedomäne führt (Vyas, Vyas et al. 1987). Für den Maltosesensor ist eine solche Calcium-Bindungsstelle bisher nicht beschrieben worden. Es ist aber anzunehmen, dass wegen des identischen Verhaltens beider Sensoren die gleiche Ursache zugrunde liegt. Darüber hinaus konnten diese Effekte nicht auf die isolierten Fluoreszenzproteine zurückgeführt werden, was ein weiterer Hinweis dafür ist, die Ursache bei den periplasmatischen Bindedomänen zu suchen. Während die einwertigen Metallchloride keinen Einfluss auf das Fluoreszenzverhalten zeigten, reagierten die GFP-Varianten negativ auf Natriumphosphat in Konzentrationen >10 mM.

Dies lenkte das Augenmerk vor allen Dingen auf die *in vitro*-Kalibration der Sensoren, da hier häufig Phosphatpuffer zum Einsatz kommen. Sie zählen zu den Standardpuffern für FRET-basierte Fluoreszenzbiosensoren. Als Konsequenz wurden diverse Standardpuffer auf ihre Vergleichbarkeit untereinander getestet, und zwar MOPS, HEPES, Tris-HCl und Natriumphosphatpuffer (**Abbildung 3-10**). Auch hier zeigte sich abermals, dass der Phosphat-Puffer eine signifikant andere Signalantwort hervorrief, als die übrigen Puffer: Beim Glucosesensor flachte die S-Kurve ab, beim Maltosesensor wurde sie steiler.

Die Sensitivität gegenüber Phosphat führte zu Untersuchung von Metaboliten, die ebenfalls Phosphat-Gruppen enthalten. So wurden ATP, ADP, AMP, NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH sowie cGMP und GTP über einen breiten Konzentrationsbereich getestet, um einen möglichst umfassenden Eindruck über die Sensorsensitivitäten gegenüber diesen Substanzen zu erhalten. Die Ergebnisse bestätigten zum einen den Effekt von Phosphat als eine kritische Komponente bei Messungen mit Sensoren des untersuchten Typs ist. Das Beispiel von AMP, ADP und ATP zeigt, dass der Quenching-Effekt mit steigender Phosphatester-Anzahl zunimmt (**Abbildung 3-15**), der nicht nur bei den Sensoren sondern auch bei den isolierten Fluoreszenzproteinen beobachtet wird (**Abbildung 3-16**), und daher vermutlich auf die Wechselwirkung der GFP-Derivate mit den Adenosinphosphaten basiert. In der Literatur findet sich ein Hinweis auf die ATP-Sensitivität von ECFP, die auf die Position His148 zurückgeführt wird (Borst, Willemse et al. 2010). Es gibt jedoch keine naheliegende

biochemische Erklärung, warum Phosphate ausgerechnet mit diesem Histidin interagieren sollten und über die Natur dieser Wechselwirkung. Die Autoren konnten diese Position auch nur identifizieren, da sie eine ECFP-Variante (*Cerulean*), die an dieser Position kein Histidin trägt, parallel vermessen haben, die diese Anfälligkeit nicht zeigt.

Betrachtet man die 3D-Struktur von ECFP, fällt jedoch im Bereich des His148 auf, dass in der direkten Umgebung dieser Aminosäure das β -barrel an zwei Stellen nicht geschlossen ist. Diese Öffnungen ermöglichen den direkten Zugang zum Chromophor (**Abbildung 4-1**). Die eine Öffnung (**Abbildung 4-1-a**) wird in der Kristallstruktur durch zwei Wassermoleküle (rot) besetzt, die eine Brücke für Wechselwirkungen nach außen bieten könnten. Die andere, sehr viel größere, Öffnung ermöglicht für niedermolekulare Substanzen den direkten Zugang zum Chromophor (**Abbildung 4-1-b**). Anhand der vorliegenden 3D-Struktur konnte dieser Zugang mit einer Dimension von 0,65 nm x 0,8 nm bemessen werden. Dies ist ausreichend für den Kontakt beispielsweise mit Adenosinphosphaten oder den Nicotinamidadeninukleotiden die etwa 0,4 x 1,2 nm bemessen. Von der Ober- und Unterseite des *barrels* ergeben sich entsprechend der 3D-Strukturen keine Zugänge zum Chromophor. Es ist folglich möglich, dass viele der beobachteten Effekte auf solche Schwachstellen in der GFP-Struktur zurückzuführen sind.

Im Umkehrschluss könnte es von Interesse sein, gezielte Mutationen einzufügen, um diese Bereiche zu verschließen. Es kann vermutet werden, dass dies Einfluss auf die Quantenausbeute haben könnte, die jedoch auch positiv ausfallen könnten. Jedenfalls wäre der Versuch lohnenswert, ließen sich doch mit einer vollständigeren Abschirmung des Chromophors eventuell viele Sensitivitäten vermeiden. Am erwähnten Beispiel von ECFP und *Cerulean* zeigt sich sehr anschaulich, dass sich diese „Schwachstelle“ bei den GFP-Varianten sehr unterschiedlich auszuwirken scheint. Daher ist auch anzunehmen, dass sich die Zugänglichkeit zum Chromophor je nach Faltung des *barrels* bei den Derivaten unterscheidet, abhängig davon ob die Stelle durch die 3D-Faltung verschlossen wird, oder nicht. Folglich müsste diese potentielle Optimierungen bei jeder Variante vermutlich angepasst werden.

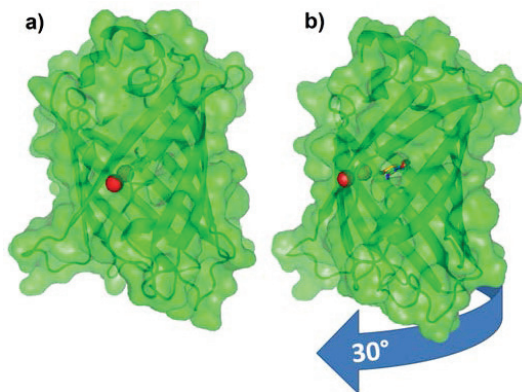


Abbildung 4-1: Die 3D-Struktur von ECFP (PDB:2WSN). Gut zu erkennen sind zwei Öffnungen in der β -barrel Struktur des GFP-Fasses. Die kleinere **a)** ist mit zwei Wassermolekülen (rot) besetzt. Die größere Öffnung **b)** gibt den Blick auf das Chromophor frei und ist vielleicht für den Einfluss der Umgebungsbedingungen auf die Fluoreszenzeigenschaften mit verantwortlich.

Die Ergebnisse mit den Nicotinamidadenindinukleotiden (NAD(P)(H)) ergaben wesentlich komplexere Resultate, insbesondere für NADH (**Abbildung 3-17** bis **Abbildung 3-20**). NADP⁺ und NADPH haben als Phosphatreichere Moleküle zwar bereits bei geringen Konzentrationen einen stark-negativen Einfluss auf die FRET-ratio des Glucosesensors; beim Maltosesensor ist dieser Effekt jedoch kaum zu erkennen. Darüber hinaus bewirkt NAD⁺ bei beiden Sensoren mit steigender Konzentration eine kontinuierliche Abnahme der FRET-ratio. Die Messungen mit NADH hingegen führten zu komplexen Fluoreszenzeffekten, weil NADH bei der Anregungswellenlänge des ECFP-Donors von 428 nm ein sehr breites Emissionsspektrum zeigt und ebenfalls im Bereich von 450 - 550 nm fluoresziert. Aus dieser Überlappung der Absorptions- und Emissionsspektren mit denen der GFP-Derivate ergeben sich nicht-kontinuierliche Effekte (**Abbildung 3-19**). Allerdings treten diese Effekte erst bei höheren NADH-Konzentrationen auf und scheinen daher zumindest für *E. coli* nicht relevant (**Tabelle 3-3**).

Die Auswertung der Guanosinphosphate cGMP und GTP zeigte auf den ersten Blick zwar auch, dass GTP einen negativen Effekt auf das FRET-Verhältnis hat (**Abbildung 3-21** bis **Abbildung 3-22**). Allerdings ergab die Analyse der isolierten Fluoreszenzproteine nur eine sehr geringe Sensitivität, die die starke Wirkung von GTP auf die Biosensoren nicht erklärt und daher eher auf eine Wechselwirkung mit den Bindedomänen hinweist.

Wechselwirkungen mit den Bindedomänen sind messtechnisch schwer zu erfassen und können immer nur über die Fluoreszenzeffekte der Sensoren indirekt gemessen werden. Da die bindenden Wechselwirkungen mit den Liganden jedoch auch ausschließlich auf nicht kovalenten Kräften beruhen, können diese natürlich auch durch die Umgebungsbedingungen beeinflusst werden, wodurch sich der K_d-Wert ändern kann.

Dass diese periplasmatischen Bindedomänen sich ebenso durch Umweltparameter beeinflussen lassen, deuten die Untersuchungen zum Einfluss von *molecular crowding* auf die Affinität der Sensoren an (**Abbildung 3-27** bis **Abbildung 3-38**). Je nach Art und Konzentration des *crowders* konnten erhebliche Affinitätsänderungen gemessen werden. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, sollte ein zusätzliches Kontrollexperiment angeschlossen werden, bei dem gezeigt wird dass die *crowder* keinen Einfluss auf die isolierten GFP-Derivate und ihre Fluoreszenzeigenschaften haben. Diese Art der Affinitätsbeeinflussung wurde zwar häufig bei Enzymen beschrieben (Zhou, Rivas et al. 2008), jedoch lassen sich bei diesen die Effekte direkt über die analysierte Reaktion nachweisen. Bei den Sensoren geht dies nur indirekt über das Fluoreszenzsignal, welches aber ebenso beeinflusst zu werden scheint. Es ist somit zwar in vielen Fällen anzunehmen, dass der *crowding*-Effekt ebenso für die hier untersuchten Biosensoren zu gelten scheint. Jedoch muss eine Interaktion mit den Fluoreszenzproteinen quantitativ erfasst werden, um dies konkret zu berechnen.

Für eine *in vivo*-Anwendung der Sensoren kann dies in jedem Fall von Interesse sein, da die *crowder* die Möglichkeit bieten, *in vivo*-Verhältnisse „zu simulieren“, vorausgesetzt die entsprechenden Eigenschaft (z.B. Viskosität) des Cytosols wären bekannt. Genau dies stellt jedoch eine große Problematik dar. Zwar gibt es Ansätze, in denen durch *Fluorescence Recovery after Photobleaching* (FRAP) mittels Protein-Mobilität auf die Viskosität des Cytosols geschlossen wurde (Elowitz, Surette et al., 1999), jedoch ist die Komposition hinsichtlich des mittleren Molekulargewichts von und Form aufgrund der Komplexität unbekannt und es kann bezweifelt werden, dass man das Cytosol in seiner gesamten Komplexität für *in vitro* Kalibrationen einfach nachstellen kann.

Mit dem FMN-basierten Fluoreszenzprotein *EcFbFP* konnte eine interessante Alternative zum Donorprotein ECFP aufgezeigt werden, da *EcFbFP* eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber vielen Umgebungsparametern und intrazellulären Komponenten zeigt (**Abbildung 3-40** bis **Abbildung 3-46**). Die Konstruktion eines funktionalen Sensors, bei dem die blau-fluoreszierenden Domänen ausgetauscht wurden, bedarf weiterer Optimierung durch Einfügen entsprechender Linker, um den Abstand von Donor und Akzeptor zu vergrößern. Denn aktuell lässt sich keine FRET-Verschiebung nach Ligandbindung mit einfachen Messtechniken feststellen; vermutlich, weil die FRET-Partner im Liganden-freien Zustand bereits zu nahe beieinander liegen, oder die Orientierung zueinander optimiert werden muss (**Abbildung 3-47**).

Im Zuge der, durch die Kooperationspartner Dr. Gensch und Dr. Fron durchgeführten Fluoreszenzlebensdauermessungen konnte gezeigt werden, dass im Fall des Glucosesensors mit integriertem Donor ein superschneller FRET (*ultrafast FRET*) vorliegt (Picosekundenbereich), wohingegen die terminale Fusionierung beim Maltosesensor in einem FRET im Nanosekundenmaßstab resultiert (**Abbildung 3-49** bis **Abbildung 3-53**). Dies liefert ein Indiz dafür, dass diese Integration für den schnelleren FRET verantwortlich sein könnte. Wie in Abschnitt 3.2.10 angegeben sind jedoch weitere Versuche notwendig, um diese These zu beweisen.

Die Zielsetzung, mit genetisch kodierten FRET-basierten Biosensoren quantitative *in vivo* Messungen zu ermöglichen, scheint aktuell noch fern. Zu komplex sind die Wechselwirkungen der Fluorophore und der Bindedomänen mit den Komponenten in der Zelle, von denen nur einige in dieser Arbeit untersucht wurden, sowie die Einflüsse des Cytosols auf das Fluoreszenzsignal. Die Kalibrierung erweist sich dabei als grundsätzliches Problem, denn der Vorteil der Nutzung solcher Biosensoren für quantitative Messungen besteht nur dann, wenn die jeweilige Metabolitkonzentration in der Zelle ohne zusätzlich aufwendige Analytik sicher erfasst werden kann (**Abbildung 3-3**). Dies erfordert die Möglichkeit der exakten *in vitro* Kalibrierung solcher Systeme über die Einwaage der zu bestimmenden Substanz, idealerweise unter Berücksichtigung der Störfaktoren (z.B. *crowding*) in der Zelle. Dies ist jedoch aufgrund der diversen Wechselwirkungen bisher nicht möglich und es erscheint auch für die Zukunft fraglich, ob die wesentlichen intrazellulären Parameter unter *in vitro* Bedingungen abgebildet werden können. Ein Ansatzpunkt, die Systeme zu verbessern, ist die Empfindlichkeit der GFP-Derivate gegenüber Umgebungsbedingungen zu verringern. Es ist sicherlich den Versuch wert, die in **Abbildung 4-1** beschriebenen Lücken in der β -barrel Struktur zu schließen, um Umgebungseinflüsse auf das Chromophor zu reduzieren. Auch die Verwendung unempfindlicherer Fluoreszenzproteine, wie das Flavin-basierte FbFP könnten helfen, robustere Sensoren zu erzeugen. Allerdings kann FbFP bisher nur das Donorprotein ECFP, nicht aber den Akzeptor ersetzen, weil es keine entsprechenden Farbvarianten gibt. Darüber hinaus werden auch die Bindedomänen durch die Umgebungsbedingungen beeinflusst, allerdings ist dieser Effekt nicht direkt messbar und wird zusätzlich durch die Einflüsse auf die Fluorophore überlagert.

Jedoch ist auf der anderen Seite in dieser Arbeit gezeigt worden, wie genau die Biosensoren unter kontrollierten *in vitro* Bedingungen funktionieren. Fokussiert man sich auf diesen Aspekt, so ergeben sich interessante Anwendungen außerhalb von lebenden Zellen. Denkbar wäre beispielsweise ein Einsatz derartiger Sensoren für die extrazelluläre Quantifizierung von sekretierten Substanzen bakterieller Produktionsstämme (z. B. Lysin).

5 Material und Methoden

5.1 Geräte

Tabelle 5-1: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller	Spezifikation
ÄKTA purifier		
Fraktionssammler	GE-Healthcare	Frac-950
pH-Messeinheit	GE-Healthcare	pH/C-900
Pumpeinheit	GE-Healthcare	P-900
UV-Messeinheit	GE-Healthcare	UV-900
Säulenkörper	GE-Healthcare	XK 26
Analytik		
UV Spektrophotometer	Shimadzu	UV-1800
CPS-Controller	Shimadzu	240A
Nano Drop Spektrophotometer	Peqlab	ND-1000
Thermometer	Amarell	ama digit ad 15th
pH-Meter	Metrohm	691
pH-Elektrode	Mettler Toledo	inLab® Micro pH
Mikrotiterplatten Lesegerät	Tecan	infinite M200
Mikrotiterplatten	Nunc	Nuncleon Surface
Immuno Module	Nunc	Immuno-modul Maxisorp F16
Polyester-Verschlussfolien	Roth	Rotilabo® Verschlussfilm
Agarose-Gelelektrophoresekammer	VWR	AGT2
Spannungsquelle	Consort	EV231
SDS-PAGE Gele	Invitrogen	Nu PAGE 4-12% Bis-Tris Gel 1mm
SDS PAGE Probenvorbereitungskit	Invitrogen	NuPAGE Novex
Silberfärbekit	Invitrogen	SilverXpress®
SDS-PAGE Kammer	Invitrogen	Novex Mini Cell
Spannungsquelle	Consort	E 831
Spektrofluorometer	Horiba	FluoroLog®-3
Inkubatoren		
Brutschrank	Heraeus	Hera cell
Brutschrank	Memmert	BP700
Schüttelinkubator	Infors HAT	Multitron Standard
Thermoschüttler	Eppendorf	Thermomixer comfort

Pipetten		
0,5-10 µL	Biohit	m10
5-20 µL		m20
20-200 µL		m200
100-1000 µL		m1000
500-5000 µL		m5000
0,5-10 µL	Eppendorf	Research ® (variabel)
10-100 µL		
20-200 µL		
100-1000 µL		
500-5000 µL		
12-Kanal Pipette 5-100 µL	Eppendorf	Research pro
Waagen		
Feinanalysenwaage	Satorius	CPA 225D
Waage	Satorius	BP2100S
Zellaufschluss		
Durchflusszelle	Dr. Hielscher	GD14K
Pumpe	Watson Marlow	504U
Ultraschallprozessor	Dr. Hielscher	UP 200s
Ultraschall Sonotrode	Dr. Hielscher	S14D
Umlaufkühler	Lauda	WKL 230
Zentrifugen		
Zentrifuge	Beckman Coulter	Avanti J-20 XP
Rotor	Beckman Coulter	JA 14
Rotor	Beckman Coulter	JA 20
Rotor	Beckman Coulter	JLA 8.1000
Zentrifugenbecher	Beckman Coulter	Polycarbonat, 1 L
Zentrifugenbecher	Beckman Coulter	Polyallomer, 250 mL
Zentrifugenbecher	Beckman Coulter	Polyallomer, 50 mL
Tischzentrifuge	Hettich	Universal 32R
Tischzentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5415D
Mikro-Zentrifuge	Roth	50518
Weitere Geräte		
Autoklav	Systec	DX-56
Celluloseacetat Filter	Satorius	11107-47-N
Centricon PLUS-70	Millipore	UFC710008
Flaschenaufsatz-Dispenser	Brand	Dispensette
Kanüle	Braun	sterican
Lyophilie	Martin Christ	Alpha 2-4
Membranpumpe	Leybold	Divac 2,4 L
Plasmidpräparationskit	Qiagen	Qiaprep® Spin Miniprep Kit
Spritzen 2 mL und 5 mL	Braun	Injekt Luerlock solo
Sterilfilter	Milex	PES 0,22 µm Express
Sterilwerkbank	BDK	
Ultrafiltrationszelle Zelle	Millipore	Amicon 8200
Ultrafiltrationsmembran	Diaflo-Amicon	30 kD Rückhalt Ø 62 mm
Ultraschallbad	VWR	Ultrasonic Cleaner
Vivaspin Röhrchen 30 kD/ 10 Kd	Sartorius	VS2022 / VS2001
Vortex	Scientific Industries	Vortex-Genie® 2

5.2 Chemikalien

Tabelle 5-2: Liste der verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Summenformel	Hersteller
3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	$C_7H_{15}NO_4S$	Biomol
Agar-Agar	$(C_{12}H_{18}O_9)_n$	Merck
Agarose	$(C_{12}H_{18}O_9)_n$	Merck
Adenosintriphosphat	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$	Roche
Adenosindiphosphat	$C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$	Roche
Adenosinmonophosphat	$C_{10}H_{14}N_5O_7P$	Roche
Ammoniumchlorid	NH_4Cl	Roth
Ampicillin-Natriumsalz	$C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$	Roth
Bovines Serumalbumin	-----	Sigma
Calciumchlorid-Dihydrat	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Merck
Coomassie Blue G250	$C_47H_{48}N_3NaO_7S_2$	Fluka
Cyclisches Guanosinmonophosphat	$C_{10}H_{12}N_5O_7P$	Roth
D-Fructose	$C_6H_{12}O_6$	Serva
D-Galactose	$C_6H_{12}O_6$	Serva
D-Ribose	$C_5H_{10}O_5$	Serva
D-(+) Cellobiose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Fluka
D-(+) Glucose-Monohydrat	$C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$	Fluka
D-(+) Mannose	$C_6H_{12}O_6$	Fluka
D-(+) Trehalose-Dihydrat	$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$	Sigma
Essigsäure	CH_3COOH	Merck
Ethanol	C_2H_5OH	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	VWR
Flavin-Adenin-Dinukleotid	$C_{27}H_{33}N_9O_{15}P_2$	Roth
Ficoll 70.000 Da	$C_{12}H_{22}O_{11}-C_3H_5ClO$	GE Healthcare
Glycerin	$C_3H_8O_3$	Merck
Guanosintriphosphat	$C_{10}H_{16}N_5O_{14}P_3$	Roth
Imidazol	$C_3H_4N_2$	Roth
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	$C_9H_{18}O_5S$	Roth
Kaliumchlorid	KCl	Merck
Kanamycin	$C_{18}H_{36}N_4O_{11}H_2SO_4$	Roth
Kresolrot	$C_{21}H_{18}O_5S$	Fluka
Lactose-Monohydrat	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Merck
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	$MgSO_4 \cdot 6H_2O$	Merck
Maltose-Monohydrat	$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$	Merck
Manganchlorid-Tetrahydrat	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	Serva
MES SDS running buffer (20x)	-----	Invitrogen
Natriumchlorid	$NaCl$	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	NaH_2PO_4	Fluka
Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD ⁺)	$C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$	Sigma
Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH)	$C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2$	Sigma
Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat (NADP ⁺)	$C_{21}H_{29}N_7O_{17}P_3$	Sigma
Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat (NADPH)	$C_{21}H_{30}N_7O_{17}P_3$	Sigma
Natriumchlorid	$NaCl$	Roth
Natriumhydroxid	$NaOH$	Merck
Ni-NTA Superflow	-----	Qiagen
PageRuler™ Plus Prestained Protein	-----	Fermentas

Pepton aus Casein	-----	Roth
Phosphorsäure	H ₃ PO ₄	Roth
Polyethylenglycol 2.000/5.000/10.000/20.000 Da	-----	Fluka
Rubidiumchlorid	RbCl	Merck
Saccharose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Sigma
Salzsäure	HCl	Merck
SimplyBlue™ SafeStain	-----	Invitrogen
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	H ₂ NC(CH ₂ OH) ₃	Merck

5.3 Medien, Puffer und Lösungen

Autoinduktions-Medium

Tabelle 5-3: Autoinduktionsmedium

Bestandteil	Konzentration
Hefeextrakt	5 g·L ⁻¹
Pepton	10 g·L ⁻¹
Glycerin	5 mL·L ⁻¹
→ ad 800 mL (autoklavieren)	
Kaliumphosphat Puffer (gesondert autoklaviert)	90 mL·L ⁻¹
Glucose (gesondert autoklaviert)	10 mL·L ⁻¹
Lactose (gesondert autoklaviert)	100 mL·L ⁻¹

Kaliumphosphat Puffer

Tabelle 5-4: Zusammensetzung des 1M Kaliumphosphat Puffers

Bestandteil	Summenformel	Konzentration [g·L ⁻¹]
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	2,13 g
Di-Kaliumhydrogenphosphat	K ₂ HPO ₄	12,54 g

Nach Lösen der Bestandteile wurde mit 1M Natriumhydroxidlösung der pH auf 7,0 eingestellt und autoklaviert.

Glucoselösung für Autoinduktionsmedium

Tabelle 5-5: Konzentration der Glucoselösung für das Autoinduktionsmedium.

Bestandteil	Summenformel	Konzentration [g·L ⁻¹]
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	50

Nachdem der Zucker vollständig in Millipor Wasser gelöst war, wurde er umgehend autoklaviert.

Lactoselösung für Autoinduktionsmedium

Tabelle 5-6: Konzentration der Lactoselösung für das Autoinduktionsmedium.

Bestandteil	Summenformel	Konzentration [g·L ⁻¹]
Lactose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	20

Nachdem der Zucker vollständig in Millipor Wasser gelöst war, wurde er umgehend autoklaviert.

Lysogeny-Broth-Medium (LB-Medium)

Tabelle 5-7: Lysogeny-Broth Medium (LB-Medium)

Bestandteil	Konzentration [g·L ⁻¹]
Natriumchlorid	10
Hefeextrakt	5
Pepton	10
(Agar-Agar)	(15)

Die eingewogenen Bestandteile des LB-Mediums wurden vor der Verwendung vollständig in VE-Wasser gelöst und dann umgehend autoklaviert. Für die Herstellung von Agar-Platten wurden dem LB-Medium vor dem Autoklavieren zudem 15 g·L⁻¹ Agar-Agar hinzugegeben. Nach Abkühlung unter 40 °C konnte optional über Spritzen mit Sterilfilteraufsätzen 1 mL·L⁻¹ der entsprechenden Antibiotika-Stocklösungen (Tabelle 5-8) zugegeben werden.

Antibiotika

Tabelle 5-8: Antibiotika-Stocklösungen, als Lösungsmittel wurde Millipor Wasser verwendet.

Bestandteil	Konzentration [g·L ⁻¹]
Ampicillin	100
Kanamycin	50

HEPES Puffer

Tabelle 5-9: HEPES Puffer

Molarität [mM]	pH bei 25 °C
20	7,3

3-N-Morpholinopropansulfonsäure Puffer (MOPS)

Tabelle 5-10: Liste der verwendeten MOPS-Puffer

Molarität [mM]	pH bei 25 °C	Konzentration [g·L ⁻¹]
5	7,3	1,05
10	7,3	2,09
20	7,3	4,19
50	7,3	10,46
75	7,3	15,69
100	7,3	20,93

Der gewünschte pH-Wert wurde bei allen Puffern mit 1 M Natronlauge eingestellt. Es wurden auch weitere pH-Werte bei 25 °C (pH 6,3/ pH 6,8/ pH 7,3/ pH 7,8 sowie pH 8,3) und Puffer mit pH 7,3 bei höheren Temperaturen benötigt. Für einen korrekten pH-Wert bei höheren Temperaturen wurde bei 25 °C mit 1 M NaOH auf pH 7,4 (35 °C) , bzw. pH 7,5 (42 °C) titriert, da gilt:

$$\text{pH}_{\text{Raumtemperatur}} = \text{pH}_{\text{Messtemperatur}} + (\text{Raumtemperatur} - \text{Messtemperatur}) \cdot (\text{Temperaturkoeffizient des Puffers}) \quad (\text{Conover, 1998}).$$

Beispiel: $\text{pH}_{\text{Messtemperatur}} = 7,3 \mid \mid \text{Raumtemperatur} = 22 \text{ °C} \mid \mid \text{Messtemperatur} = 42 \text{ °C} \mid \mid \text{Temp.koeffizient MOPS} = -0,011 \text{ °C}^{-1}$

$$\begin{aligned}
 \text{pH}_{\text{Raumtemperatur}} &= 7,3 + (22-42) \cdot (-0,011) \\
 &= 7,3 + (-20) \cdot (-0,011) \\
 &= 7,3 + 0,22 \\
 &= 7,52
 \end{aligned}$$

→ MOPS- Puffer für Messung bei 42 °C muss bei Raumtemperatur auf pH 7,52 eingestellt werden.

Natriumphosphat Puffer

Tabelle 5-11: 20 mM Natriumphosphat Puffer; pH 7,3

	Konzentration [g·L ⁻¹]
di-Natriumhydrogenphosphat	3,27
Natriumdihydrogenphosphat	0,94

Trishydroxymethylaminomethan Puffer (Tris-HCl)

Tabelle 5-12: Tris-HCl Puffer

Molarität [mM]	pH bei 25 °C	Konzentration [g·L ⁻¹]
20	8	2,42

Der gewünschte pH-Wert wurde mit 1 M Salzsäure eingestellt.

Tris-Acetat-EDTA-Puffer Puffer (TAE)

Tabelle 5-13: TAE-Puffer (50x) für Agarose-Gelelektrophorese

Bestandteil	Konzentration [g·L ⁻¹]
Tris	242
Essigsäure	54,6
EDTA	14,6

Vor der Verwendung wurde der 50-fach TAE-Puffer 1:50 mit Millipor Wasser verdünnt.

TMF-Puffer

Tabelle 5-14: TMF Puffer zur Herstellung kompetenter Zellen

Bestandteil	Konzentration [g·L ⁻¹]
CaCl ₂ ·2H ₂ O	14,7
RbCl	6,05
MnCl ₂ ·4H ₂ O	7,92

Der TMF-Puffer wurde vor der Verwendung autoklaviert.

Mg²⁺-Lösung

Tabelle 5-15: Mg²⁺-Lösung zur Herstellung kompetenter Zellen

Bestandteil	Konzentration [g·L ⁻¹]
MgCl ₂ ·6H ₂ O	101,65
MgSO ₄ ·7H ₂ O	123,24

Die Mg²⁺-Lösung wurde vor der Verwendung autoklaviert.

Metaboliten-Lösungen

Tabelle 5-16: Stocklösungen und Endkonzentrationen für ATP, ADP, AMP, NAD⁺, NADP⁺, NADH, NADPH, GTP und cGMP.
Die Substanzen wurden in 20 mM MOPS Puffer (pH 7,3) gelöst.

Stocklösungen [mM]
100
75
50
40
30
20
10
5
2,5
0,5
0,25
0

Salz-Lösungen

Tabelle 5-17: Stocklösungen und Endkonzentrationen für die Salze NaCl, CaCl₂, MgCl₂, KCl, NH₄Cl, MnCl₂, NaH₂PO₄. Die Substanzen wurden in 20 mM MOPS Puffer (pH 7,3) gelöst.

Stocklösungen [mM]
2500
250
125
25
12,5
2,5
1,25
0,25
0,125
0,025
0,0025
0

Bioinformatische Hilfsmittel

Zur Planung von Klonierungen und zur Erstellung von Plasmidkarten wurde Clone Manager (Sci-Ed Software, Cary, North-Carolina, USA) verwendet. Die 3D-Strukturanalysen wurden mit PyMol durchgeführt (DeLano Scientific LLC, San Francisco, USA). Basierend auf den Rohdaten (Excelformat) wurden alle Daten mit Origin ausgewertet und die in die Diagramme erzeugt (OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA).

Zuckerlösungen

Für alle Experimente wurden Verdünnungsreihen der von Glucose bzw. Maltose benötigt. Diese wurden in 20 mM MOPS Puffer (pH 7,3) gelöst und als serielle Verdünnung in 23 Konzentrationen zuzüglich Negativkontrolle (20 mM MOPS) angesetzt.

In Tabelle 5-18 sind die verwendeten Konzentrationen angegeben. Um eine hohe Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden große Mengen dieser Stocklösungen angesetzt, die in 96er Deepwellplatten bei -20°C gelagert wurden.

Tabelle 5-18: Zucker-Stockkonzentrationen. Zu je 90 µL Sensorlösung (0,5 mg·mL⁻¹) wurden 10 µL der Zucker-Stocklösung gegeben, die somit 1:10 verdünnt wurde. Die Sensoren weisen unterschiedliche Affinitäten auf, daher liegen die Stocks in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen.

Glucose	Maltose
0	0
0,01	0,0001
0,025	0,001
0,05	0,0025
0,1	0,005
0,25	0,01
0,5	0,025
0,75	0,05
1	0,1
2,5	0,25
5	0,5
7,5	1
10	2,5
25	5
37,5	7,5
50	10
75	25
100	50
150	75
300	100
500	300
750	750
1000	1000
2000	2000

5.4 Biologisches Material

Verwendete Bakterienstämme

Alle Versuche wurden mit Bakterienstämmen der Art *Escherichia coli* (*E. coli*) durchgeführt. Hierbei wurde für Proteinüberexpressionen *E. coli* BL21 GOLD (Stratagen, La Jolla, California, USA) und für Plasmidaufreinigung und Klonierungsarbeiten *E. coli* DH5α (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) verwendet.

Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Um das Einbringen zirkulärer DNA in *E. coli* zu ermöglichen, wurden kompetente Zellen mit der Rubidiumchloridmethode hergestellt. Hierzu wurden 5 mL LB-Medium mit *E. coli* BL21 (DE3) aus einer -80 °C Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 150 upm kultiviert. 50 mL LB-Medium wurden mit 0,5 mL dieser Vorkultur inokuliert. Dem Medium wurden 1 mL Mg²⁺-Lösung (Tabelle 5-15) steril filtriert beigelegt. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C und 150 upm inkubiert, bis

bei den regelmäßigen Stichproben photometrisch eine Absorption zwischen 0,5 und 0,7 bei 600 nm (OD_{600}) festgestellt werden konnte. Anschließend wurden die Zellen eine halbe Stunde auf Eis gekühlt, bei 4 °C abzentrifugiert (30 Minuten, 4000 upm) und in 50 mL TMF-Puffer (**Tabelle 5-14**) resuspendiert. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde das Bakterienpellet in 4 mL TMF-Puffer aufgenommen und 1 mL Glycerin zugegeben. Diese Suspension mit kompetenten Zellen wurde in 200 µL Aliquots mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingelagert.

Plasmidaufreinigung

Um ausreichend Ausgangsmaterial für das Promotionsprojekt zu erhalten, wurde *E. coli* DH5α mit den bei Addgene bestellten Plasmiden transformiert und Übernachtskulturen in LB-Medium mit Ampicillin angeimpft. Die Aufreinigung der Plasmide erfolgte mithilfe des DNA-Präparationskits *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die isolierte Plasmid-DNA wurde in Elutionspuffer bei -20 °C gelagert. Über Agarose-Gelelektrophorese wurde der Erfolg der Plamidextraktion im Hinblick auf Quantität und Qualität überprüft.

Transformation der kompetenten Zellen

Für die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* durch Hitzeschock (Hanahan 1983) wurde zu einem 50 µL-Aliquot kompetenter *E. coli* Zellen ~200 ng Plasmid-DNA hinzugegeben. Als Negativkontrolle wurde in einem Ansatz 50 µL steriles, Nuklease-freies Wasser anstelle der Plasmid-DNA hinzugegeben. Die Ansätze wurden für 30 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend 90 Sekunden bei 42 °C erhitzt und für weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Abschließend wurden 500 µL LB-Medium ohne Antibiotikum zu jedem Ansatz pipettiert und für eine Stunde bei 37 °C und 500 upm in einem Thermoschüttler (Eppendorf) inkubiert. Je 50 µL der Suspension wurden auf LB-Agarplatten mit 100 µg·mL⁻¹ Ampicillin ausplattiert und zwei Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Jede experimentelle Serie wurde mit einem frischen Transformationsansatz gestartet.

Expressionssysteme

Die Gensequenzen der verwendeten Biosensoren stammen aus den Arbeiten von Professor Wolf Frommer (Stanford, Californien, USA) wurden über <http://www.addgene.org> bestellt. Der Glucosesensor FLII12Pglu-700µΔ6 erhielt die interne Bezeichnung MP18.1.1, der Maltosesensor FLIPmal25µ wurde als MP24 gekennzeichnet. In den ursprünglichen Benennungen der Plasmide ist die Affinität gegenüber dem Zielliganden gekennzeichnet. Der Glucosesensor sollte demnach einen K_D -Wert von 700 µM gegenüber Glucose aufweisen; für den Maltosesensor ist ein K_D von 25 µM für Maltose angegeben.

Das Vektor-Rückgrat (*backbone*) beider Vektoren ist ein pRSET Plasmid mit Ampicillinresistenz (**Abbildung 5-1**). Die Expression wird durch einen T7 Promotor kontrolliert. Darüber hinaus wird ein Hexahistidin-Tag co-exprimiert und infolgedessen N-terminal an die jeweiligen Sensorkomplexe fusioniert.

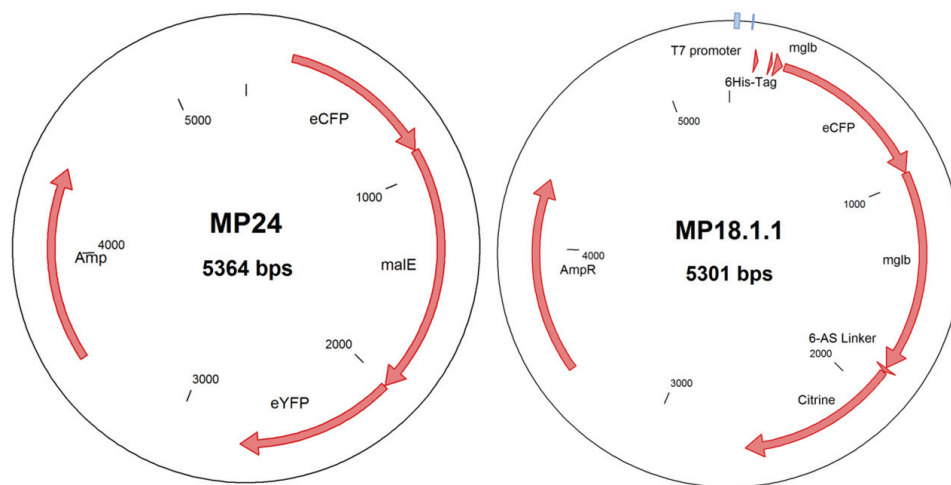


Abbildung 5-1: Schematische Darstellung der verwendeten Biosensor-Vektoren. Links: der Maltose Sensor FLIPmal25 μ (interne Bezeichnung MP24). Rechts: der Glucose Sensor FLII12Pglu-700 μ Δ 6 (interne Bezeichnung MP18.1.1). Die Sensor-kodierenden Sequenzen sind jeweils in einen pRSET-B Vektor integriert.

Für die Expression der isolierten Fluoreszenzproteine wurden aus MP24- und MP18.1.1 Vektoren die kodierenden Sequenzen für ECFP, EYFP und Citrine heraus kloniert. Die Arbeiten erfolgten teilweise in Kooperation mit Janko Potzkei vom Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine Universität.

Die Sequenz von ECFP einschließlich His-Tag wurde aus MP24 in einem petDuet-1 Vektor kloniert (**Abbildung 5-2**). Auch in dieser Vektor trug ein Resistenzgen gegen Ampicillin und eine T7-Promotorregion. Die Klonierung erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *NotI*.

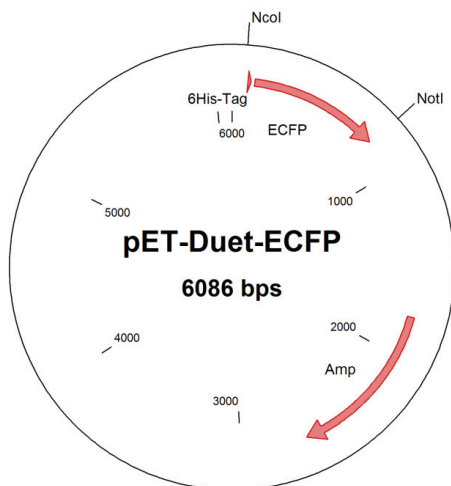


Abbildung 5-2: Vektorkarte des pET-Duet-ECFP Vektors. Über *NcoI* und *NotI* wurde daer Hexahistidin-Tag und die kodierende Sequenz für das ECFP eingebracht.

Die beiden gelben Fluoreszenzproteine wurden in pRhotHi-2 Expressionsvektoren kloniert. Dieser trägt eine Kanamycin Resistenz und ebenso wie alle verwendeten Vektoren eine T7 Promotorregion. Die Klonierung erfolgte in beiden Fällen über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* (**Abbildung 5-3**).

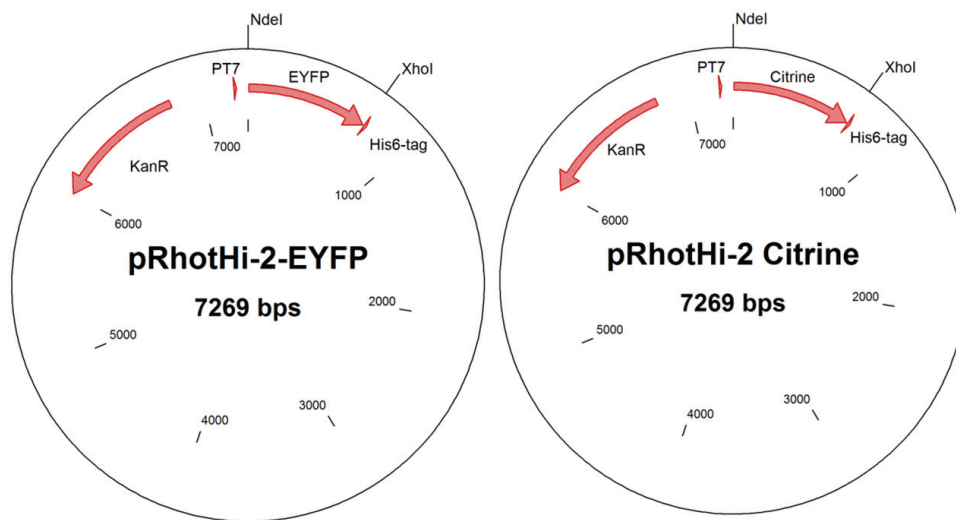


Abbildung 5-3: Vektorkarte der pRhotHi-2 Vektoren, in die Gene für die isolierten gelben Fluoreszenzproteine kloniert wurden. Über *NdeI* und *XhoI* wurden in beiden Fällen ein Hexahistidin-Tag und die kodierende Sequenz für das EYFP (links) und Citrine (rechts) eingebracht.

Als Alternative zu dem in MP24 und MP18.1.1 enthaltenen FRET-Donorprotein ECFP wurde zudem ein FMN-basiertes Fluoreszenzprotein aus *E. coli* (*EcFbFP*) exprimiert und gereinigt. Das Plasmid hierfür stammt aus einer Kooperation mit der AG Drepper (Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Uni-Düsseldorf). Es handelt sich dabei um einen pRhotHi-2 Vektor, in den über die Schnittstellen *XbaI* und *XhoI* die Gensequenz für das *EcFbFP* eingebracht wurde (**Abbildung 5-4**). Zudem enthält es eine Antibiotikaresistenz gegen Kanamycin und ein T7-Promotor.

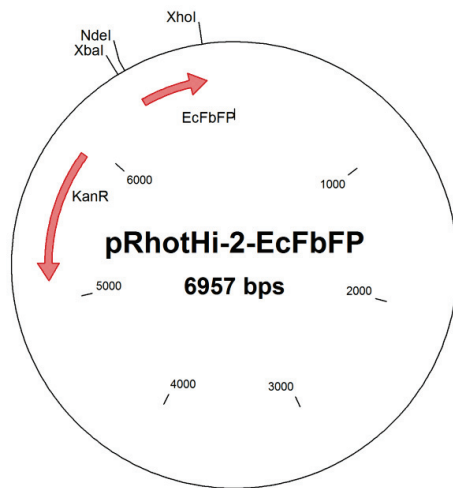


Abbildung 5-4: Vektorkarte des pRhotHi-2 Vektors, in den das Gen für das FMN-basierte Fluoreszenzprotein *EcFbFP* eingebracht wurde. Über *XbaI* und *XhoI* wurde die kodierende Sequenz in den Vektor kloniert. Die Antibiotikaresistenz für eine selektive Kultivierung ist Kanamycin.

Als erster Prototyp für die Weiterentwicklung der bestehenden Sensoren wurde das Donorprotein des Glucosesensors (ECFP) gegen *EcFbFP* ausgetauscht (**Abbildung 5-5**).

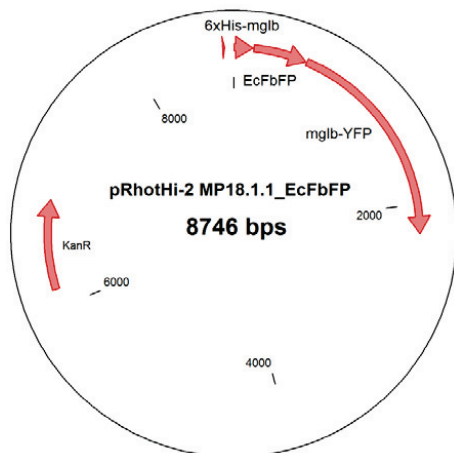


Abbildung 5-5: Vektorkarte des pRhotHi-2 Vektors, in den die Sequenz für den Glucosesensor MP18.1.1, bei dem das ECFP durch das FMN-basierte Fluoreszenzprotein *EcFbFP* ausgetauscht wurde. Die Antibiotikaresistenz für eine selektive Kultivierung ist Kanamycin.

Die Klonierungsarbeiten für die neuen Sensorkonstrukte wurden von Kooperationspartnern aus dem IMET durchgeführt. Die Klonierstrategie sah vor das ECFP jeweils analog zum ECFP an der jeweiligen Position im Sensor auszutauschen. Für den Glucosesensor MP18.1.1 bedeutete dies *EcFbFP* molekular in das *mglb*-Gen des Bindeproteins zu integrieren. Beim Maltosesensor MP24 sollte es terminal vor das Gen für das Maltosebindeprotein (*maltE*) fusioniert werden (**Abbildung 5-6**).

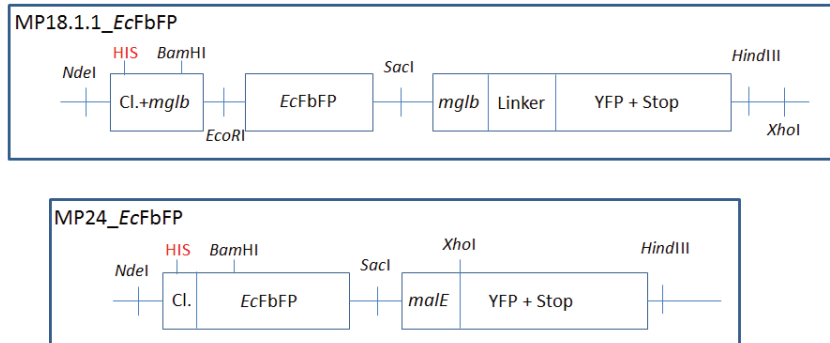


Abbildung 5-6: Sensorvarianten MP18.1.1_EcFbFP (oben) und MP24_EcFbFP (unten). Der ursprüngliche Donor ECFP sollte gegen EcFbFP ausgetauscht werden (Grafik J.Potzkei/ IMET). Eingezeichnet sind relevante Restriktionsschnittstellen und die Bezeichnung für die jeweilige Sensorkomponente.

5.5 Kultivierung und Reinigung der Biosensor-Proteine

Kultivierung Biosensoren

Die Kultivierung der Biosensoren erfolgte in autoklavierten 2 L-Erlenmeyerkolben mit zwei oder vier Schikanen. Dem LB-Medium wurde zunächst steril $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ Ampicillinlösung (**Tabelle 5-8**) zugegeben, sodass eine Ampicillinendkonzentration von $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ eingestellt wurde. Je 400 mL des Mediums wurde mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte angeimpft und bei 28°C und 100 upm über 48 h ohne Induktion mit IPTG kultiviert. Anschließend wurden die *E. coli*-Bakterien per Zentrifugation vom Medium getrennt (**Tabelle 5-19**) und die Pellets entweder direkt weiter verwendet oder bei -20°C eingefroren.

Kultivierung isolierter Fluoreszenzproteine

Die Kultivierung der isolierten Fluoreszenzproteine erfolgte analog zu der Kultivierung der Biosensoren. Die einzig relevante Anpassung war die Umstellung auf ein Autoinduktionsmedium (**Tabelle 5-3**) mit Kanamycin-Zugabe ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Der Anlass für diese Modifikation des Antibiotikums lag in der molekularen Isolierung der Fluoreszenzproteine, da diese Schnittstellenbedingt in andere Expressionssysteme umklontiert wurden, bei denen es einer Induktion bedurfte, um eine ausreichende Proteinausbeute zu erhalten.

Bei dem verwendeten Medium wird die enthaltene Glucose zunächst von den Bakterien konsumiert, was im Gegensatz zum zuckerfreien LB-Medium, in einer höheren Biomassenproduktion resultiert. Zu diesem Zeitpunkt agiert die Glucose zudem als Inhibitor und verhindert eine verfrühte Expression. Im Anschluss fungiert die ebenfalls enthaltene Lactose als Induktor für die Expression. Auf diese Art konnte die doppelte Ausbeute an Biofeuchtmasse erzielt werden.

Je 400 mL des Autoinduktionsmediums wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei nur 22°C und 100 upm für 48 Stunden, um die Menge von Einschlusskörperchen (inclusion bodies) zu reduzieren. Abschließend wurden die Bakterien per Zentrifugation vom Medium

getrennt (Tabelle 5-19) und die Pellets entweder direkt dem Zellaufschluss zugeführt oder bei -20°C eingefroren.

Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss wurden Bakterienpellets in 20 mM MOPS Puffer (pH 7,3) resuspendiert (Tabelle 5-10). Der Zellaufschluss erfolgte über Ultraschall in einem doppelwandigen Durchflussgefäß (Abbildung 5-7). Dabei wurde der Mantel mit einem 2 °C kaltem Ethylenglykol/Wasser-Gemisch (40:60) durchströmt, wodurch die Bakteriensuspension im Gefäßinneren, stark abgekühlt wurde. Die Suspension selbst wurde ebenfalls durch eine externe Pumpe in einem Kreislauf bewegt, um einen möglichst homogenen Zellaufschluss zu gewährleisten und ein Sedimentieren der Zellen zu verhindern. Dieser Prozess wurde für 60 Minuten bei einer Amplitude von 40 % und einem Ultraschall-Zyklus von 0,5 durchgeführt. Abschließend wurden die Zelltrümmer in zwei weiteren Zentrifugationsschritten abgetrennt (Tabelle 5-19) und der Rohzellextrakt umgehend der Protein-chromatographie zugeführt. Zu diesem Zeitpunkt wies die Lösung bereits eine grelle Grünfärbung auf, die eine erfolgreiche Überexpression der Sensorproteine belegte.

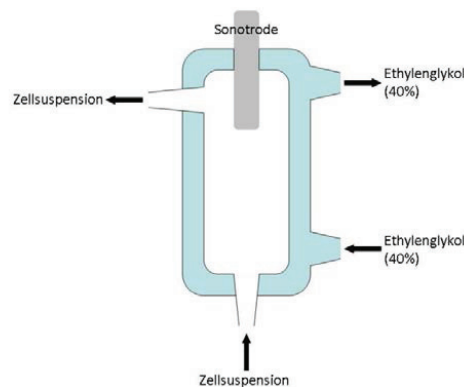


Abbildung 5-7: Schemazeichnung der Durchflusszelle für den Zellaufschluss (Zeichnung: Baierl, 2010).

Tabelle 5-19: Zentrifugationsschritte vor und nach dem Zellaufschluss; Zentrifuge: Beckmann Coulter Avanti J-20 XP.

Schritt	Rotor	Drehzahl [upm]	Zeit [min]	Temperatur [°C]
Zellabtrennung	JLA-8.1000	8000	30	4
Zelltrümmerabtrennung	JA-20	20000	10	4

Affinitätschromatografische Aufreinigung der Zielproteine

Über den fusionierten Hexahistidin-Tag konnten die Biosensoren mittels immobilisierter Metallionen Affinitätschromatografie (IMAC) gereinigt werden (Kees 2001). Hierzu wurde das Chromatographiesystem ÄKTApurifier von GE Healthcare eingesetzt. Die daran angeschlossene Säule (XK 26 Ø: 2,6 cm) war mit 50 mL Ni-NTA Chromatographiematerial gefüllt. Die Arbeitsschritte der Chromatographie sind in **Tabelle 5-20** aufgeführt. Die hierbei verwendeten Puffer wurden zuvor filtriert (Cellulose-Acetatfilter 0,22 µm, Satorius) und mit Argon ($10 \text{ min} \cdot \text{L}^{-1}$) entgast. Vor der Probenaufgabe wurde die Säule mit 20 mM MOPS, pH 7,3, äquilibriert. Um unspezifische Bindungen an das Säulenmaterial zu minimieren, wurde der Rohzellextrakt vor der Beladung mit 20 mM Imidazol versetzt. Nach der Probenaufgabe wurden ungebundene Bestandteile in einem Waschschritt von 3 Säulenvolumen entfernt. Abschließend wurde der Sensor durch einen Imidazolgradienten von 50-100 % Imidazol in 20 mM MOPS pH 7,3 mit 250 mM Imidazol eluiert und mithilfe des automatischen Fraktionssammlers in Probenröhrchen zu je 5 mL aufgefangen. Der Erfolg der Reinigung ist durch ein SDS-Gel mit Silberfärbung in **Abbildung 5-8** gezeigt.

Tabelle 5-20: Schritte der chromatographischen Reinigung mit dem ÄKTApurifier System.

Schritt	Puffer	Säulenvolumen
Äquilibrieren	20 mM MOPS pH 7,3	3
Probenaufgabe	Rohzellextrakt	variabel
Waschen	20 mM MOPS pH 7,3	3-10
Eluieren	20 mM MOPS pH 7,3 250 mM Imidazol	2
Waschen	20 mM MOPS pH 7,3	3
Reinigen	Millipor Wasser	3
Einlagern	20 % Ethanol	3

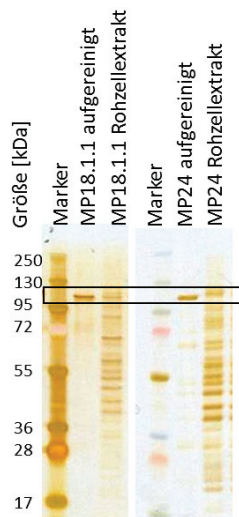


Abbildung 5-8: SDS-Gel von Expressionsproben vor und nach der Reinigung mit Silberfärbung. Gut zu erkennen ist die erfolgreiche Isolierung der Biosensorproteine nach der beschriebenen Aufreinigung.

Ultrafiltration

Das Eluat der Reinigung wurde umgehend mit Zentrifugationsröhrchen (Vivaspin, Sartorius/Centricon, Millipore) oder einer Amicon Zelle (Sartorius) entsalzt, um das Imidazol zu entfernen. Außerdem wurde die Ultrafiltration auch zum Umpuffern in alternative Puffer. Für die Biosensoren (~110 kDa) wurden die Ultrafiltrationen mit einer 30 kDa-Membran durchgeführt. Bei isolierten Fluoreszenzproteinen (~30 kDa) wurden 10 kDa Membranen verwendet. Insgesamt wurden mindestens drei vollständige Volumenaustausch-Schritte durchgeführt, um das Imidazol herauszuverdünnen. Die Lagerung des gereinigten Proteinmaterials erfolgte standardmäßig in MOPS-Puffer (pH 7,3) bei -20 °C. Dieser Puffer wurde aufgrund seines günstigen pH-Temperatur Koeffizienten ($0,011 \cdot ^\circ\text{C}^{-1}$) gewählt, sodass sich bei derart starken Temperaturänderungen bis zur nächsten Verwendung der pH nur minimal verschob.

5.6 Analytik

Agarose-Gelelektrophorese

Durch Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt (Bader and Beck-Sickinger 2004). Dabei wandern die Fragmente, aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA, durch das Agarosegel zur Anode. Für das Agarosegel wurde 1 % (w/vol) Agarose in TAE-Puffer (**Tabelle 5-13**) aufgekocht und in die Elektrophoresekammer gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit TAE-Puffer überschichtet. Zu 8 µL Probe wurden 2 µL Ladepuffer (5x Loading Dye, Qiagen) gegeben und die Probe sowie ein Längenmarker anschließend auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von 120 V für 35 Minuten. Da Klonierungsarbeiten nicht selbstständig im Rahmen dieser Arbeit ausgeführt wurden, beschränkte sich die Anwendung der Agarosegele auf den Qualitätsnachweis der regelmäßig durchgeführten Plasmidpräparationen.

DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Mikro-Volumen Spektrophotometer

Zusätzlich zu Agarosegelen, wurde im Anschluss die DNA-Konzentration UV-spektrometrisch über die Absorption bei 260 nm bestimmt. Die Messung erfolgte im 1,5 µL Maßstab mit einem Mikrovolumen UV-Vis Spektrophotometer (NanoDrop, peqlab). Als Kontrolle diente der bei der Plasmidpräparation verwendete Elutionspuffer, da die zu analysierenden Proben ebenfalls in diesem Puffer vorlagen.

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration gereinigter Sensormoleküle wurde mit der Proteinbestimmungsmethode nach Bradford ermittelt (Bradford 1976). Der photometrische Test beruht auf der Bindung von Proteinen an Coomassie Brilliant Blue G-250. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm. In einer Küvette wurden hierfür 900 µL Bradfordreagenz und 100 µL Probe gemischt. Die Probe wurde zuvor je nach Ausgangskonzentration mit 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3, verdünnt. Als Kontrolle wurden 100 µL des verwendeten Verdünnungspuffers zu 900 µL Bradfordreagenz zugegeben. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Anhand einer mit bovinem Serumalbumin (BSA) erstellten Kalibrierung wurde die Proteinkonzentration berechnet.

Konzentrationsbestimmung über die spezifische Absorption der Fluoreszenzproteine

Da die Konzentrationsbestimmung mittels Bradford nur mit gereinigten Proteinen sinnvoll ist, in der vorliegenden Arbeit aber auch mit komplexeren Lösungen, wie Rohzellextrakt gearbeitet wurde, wurde eine weitere Methode etabliert, um die Konzentration der Sensoren einstellen zu können.

Da die GFP-basierten Fluoreszenzproteine der Biosensoren mit YFP-Derivaten abgesehen von der Absorption bei 280 nm infolge ihrer Fluoreszenzeigenschaften eine spezifischen Absorption bei 517 nm aufweisen, der weit vom Absorptionsmaximum anderer Proteine entfernt liegt, war es möglich selbst in komplexerer Lösungen die Konzentration der Sensoren auf einen einheitlichen Absorptionswert der gelb-fluoreszierenden Proteine (YFPs) einzustellen. Da der Extinktionskoeffizient der YFPs ($77000\text{--}83400\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) größer ist, als der der blau-fluoreszierenden Proteine (ECFP: $32500\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ oder EcFbFP: $31000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), hob sich ihr Absorptionswert selbst bei geringen Konzentrationen in Rohzellextrakt vom Hintergrundsignal noch klar ab (**Abbildung 3-23**).

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde genutzt, um die Reinheit der gereinigten Sensorlösungen zu überprüfen, indem die Proteine einer Probe ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (Lämmli 1970). Hierfür wurde die Probe zunächst mit Natriumdodecylsulfat denaturiert, wodurch die Proteine entfaltet und negativ geladene Komplexe gebildet werden. Durch diese negative Gesamtladung wandern die Proteine nun mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, allein aufgrund ihres Molekulargewichts, im elektrischen Feld. Das Verfahren diente im vorliegenden Projekt nicht zum Expressionsnachweis der Sensoren, da dies an der Färbung der Lösung, an den Fluoreszenz-Emissionsspektren, oder auch mittels Ligandenzugabe schneller und einfacher getestet werden konnte. **Tabelle 5-21** zeigt, wie die Proben für SDS-PAGE angesetzt wurden. Entsprechend dem Herstellerprotokoll wurden die Proben vor der Aufgabe auf das Gel für zehn Minuten bei 70 °C erhitzt. Die Bis-Tris Gele (1 mm, 4-12%, NUPAGE, Invitrogen) wurden vor Verwendung gründlich mit VE-Wasser abgespült und in eine Elektrophoresekammer (Novex Mini Cell, Invitrogen) gespannt. Die Kammern wurden mit 1x MES-Laufpuffer gefüllt. In die innere Kammer wurde zudem 500 µL Antioxidant (Invitrogen) zugegeben. Je Probe wurden 10 µL in die Taschen des Gels aufgetragen. Als Proteinlängenmarker wurden 3 µL des PageRuler™ Plus (Prestained Protein Ladder 10–250 kDa, Fermentas) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von 200 V für 45 Minuten. Der Laufpuffer wurde bis zu dreimal wiederverwendet.

Tabelle 5-21 Ansatz für SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Bestandteil	Volumen [µL]
Probe	16,25
Nu PAGE® LDS Sample Preparation Buffer	6,25
Nu PAGE® Reducing Agent	2,5
Gesamtvolumen	25

Proteinfärbung nach Gelelektrophorese

Für die Färbung der Proteinbanden wurden die Gele mit einer kommerziell erhältlichen Silberlösung (SilverXpress®, Invitrogen) nach Standardprotokoll des Herstellers behandelt. Als alternative Färbemethode wurde Coomassie Blaufärbung eingesetzt. Hierbei wurde je Gel 35 mL des kommerziellen SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen) nach Herstellerangaben eingesetzt.

Fluoreszenzlebensdauer Messungen

Alle Fluoreszenzlebensdauer Messungen wurden von den Kooperationspartnern Dr. Gensch (ICS-4) und Dr. Eduard Fron KU Leuven durchgeführt. Als Probenmaterial wurden eigens hergestellt aufgereinigte Proteinlösungen in 20 mM MOPS Puffer bereitgestellt. Die Einstellung der Proteinkonzentration wurde vom Experimentator selbst vorgenommen. Da manche Vorversuche höhere Proteinkonzentrationen verlangten, wurde das Proteinmaterial höher konzentriert vorbereitet ($> 5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$).

Fluoreszenzintensitätsmessung mit FRET

Abgesehen von den spektroskopischen Analysen im Küvettenmaßstab, erfolgten alle weiteren Fluoreszenzmessungen mit einem Mikrotiterplatten-Lesegeräte (Microplate-Reader, TECAN M200). Der Aufbau ist schematisch in **Abbildung 5-9** dargestellt. Der Reader verfügt über zwei Doppelmonochromatoren und verwendet als Lichtquelle eine UV-Xenon-Blitzlampe. Der Detektor für die Fluoreszenz ist ein Photomultiplier Modul (PMT). Wahlweise kann das Anregungslicht, ebenso wie das Auslesen der Emission, von unten oder oben erfolgen. Absorption kann über eine UV-Silizium-Photodiode gemessen werden. Die Messkammer im Reader ist temperierbar, wobei die Temperatur minimal 4°C über Raumtemperatur beginnt, da das Gerät nicht aktiv kühlen kann. Maximal ist eine Temperatur von 42°C einstellbar. Für den ebenfalls vorhandenen M1000 Reader ist die Z-Achse der Messkammer anpassbar, was für Messungen mit ganzen Zellen vorteilhaft ist, da sich diese am Boden absetzen können.

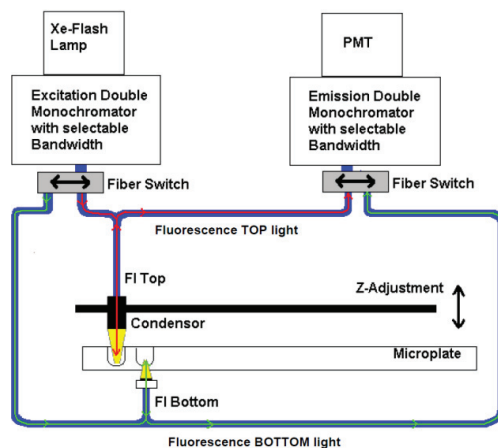


Abbildung 5-9: Aufbau der Reader Messtechnik (Grafik: Tecan Handbuch).

Intensitätsmessung der Fluoreszenz-Signale

Für die Fluoreszenzintensitätsmessungen wurden ein Readerskript mit den in **Tabelle 5-22** angegebenen Parameter geschrieben, dass für alle beschriebenen Untersuchungen angewendet wurde.

Tabelle 5-22: Einstellungen für die Messung der Fluoreszenzintensität von ECFP und EYFP/ Citrine am TECAN M200 Reader

Parameter	Einstellung
Modus	Fluoreszenzmessung von unten
Anregungswellenlänge	428 nm
Emissionswellenlänge	EYFP/ Citrine: 528 nm // ECFP: 485 nm
Anregungsbandbreite	9 nm
Emissionsbandbreite	20 nm
Verstärkung	manuell (90)
Anzahl der Blitze	10
Integrationszeit	20 μ s
Verzögerungszeit	0 μ s
Ruhezeit	0 ms
Schütteln vor Messung	Linear 10 sek/ Intensität 3
Zyklen	10

Aufnahme von Emissionsspektren

Für die Aufnahme von Emissionsspektren im Reader wurden die Proben bei 428 nm von unten angeregt (Bandbreite von 9 nm). Die Emission wurde anschließend von 460 nm bis 600 nm bei einer Bandbreite von 20 nm ausgelesen. Das Füllvolumen lag standardisiert bei 100 μ L; die Proteinkonzentration ebenso einheitlich bei 0,5 mg·mL⁻¹.

Da jedoch vor allem bei den isolierten, gelben Fluoreszenzproteinen (EYFP und Citrine) das Anregungsmaximum (517 nm) sehr nah beim Emissionsmaximum (528 nm) liegt und die Bandbreiten des Readers nicht fein genug einstellbar waren (9-20 nm), wurden für die in der Dissertation präsentieren Spektren mit einem modularen Fluoreszenz Spektrofluorometer aufgezeichnet (Horiba FluoroLog®-3, Kyoto, Japan). Dieses ist mit einer Helium/Xenon-Lampe ausgestattet und kann eine deutlich schärfere Bandbreitentrennung von 0,5 nm realisieren. Nach einer Testserie zur identifizierung der optimalen Messparameter wurden die Anregungs- und Emissions-Bandbreiten auf 2,5 nm eingestellt, um ein gutes Verhältnis zwischen Trennschärfe und Lichtintensität zu erreichen (**Abbildung 6-5 - Abbildung 6-9**). Die Proteinlösungen wurden mit einer Konzentration von 0,5 mg·mL⁻¹ in 1 mL Quartzküvetten temperiert bei 25 °C vermessen.

Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_d -Wert)

Für die Bestimmung der Bindungsaffinität über die Dissoziationskonstante (K_d -Wert), wurden in 24 wells je 90 μ L Sensorlösung in transparenten 96-well Mikrotiterplatten (Nunc F) vorgelegt. Die Konzentration der Sensorlösung wurde standardmäßig auf einen Wert von 0,5 mg·mL⁻¹ eingestellt, da sich in diesem Konzentrationsbereich ein konstantes $\frac{YFP}{CFP}$ -Verhältnis (ratio) zeigte (Baierl, 2010). Bei zu hohen Konzentrationen an Fluoreszenzproteinen kann es zu *Quenchingeffekten* und einer

Verschiebung des FRET-Verhältnisses kommen. Die Messkammer des Readers wurde für das Experiment ebenso auf die Zieltemperatur vortemperiert, wie die Zucker-freie Sensorlösung. Anschließend wurden je 10 µL einer 24er Zuckerverdünnungsreihe zugegeben, sodass ein Endvolumen von 100 µL je *well* erreicht wurde. Liganden und Sensoren waren dabei stets im gleichen Puffer gelöst. Die Messung wurde in zehn Zyklen entsprechend **Tabelle 5-22** ausgeführt. Jede Messungsreihe bestand aus drei Replikaten auf derselben Mikrotiterplatte.

Für die Berechnung des K_d -Werts wurde zunächst für jeden Messpunkt der Quotient aus YFP- und des CFP-Emissionssignal gebildet; anschließend Mittelwert und Standardabweichung des Quotienten über alle gemessenen Zyklen eines jeden Messpunkts. Jeder Messpunkt (R) repräsentiert somit den Mittelwert mit angegebener Standardabweichung aus drei unabhängigen Replikaten über je 10 Messzyklen. Durch **Formel 5-1** konnte mittels des Programms Origin iterativ eine Ausgleichskurve durch die Messwerte gelegt werden, aus der der K_d -Wert berechnet wurde. Dabei steht R_{apo} für den Quotienten der FRET-Partner ohne Metabolit. R_{max} für den maximalen Quotienten YFP/CFP und S für die Konzentration des Zuckerliganden.

Formel 5-1: Berechnung der Bindungsaffinität über die Dissoziationskonstante (K_d -Wert).

$$R = (R_{max} - R_{apo}) \cdot \frac{S}{K_d + S} + R_{apo}$$

Temperaturmessung

Die Temperaturbestimmung auf der Mikrotiterplatte wurde in Referenz*well*s durchgeführt, um die Fluoreszenzmessung nicht zu beeinträchtigen. Die Beschreibung dieses Messverfahrens findet sich in der Bachelorarbeit von Anna Baierl (Baierl 2011). Kurz gefasst beruht die Methode auf der Änderung des pH-Werts von Tris-HCl Puffer Temperaturverschiebungen. Als Resultat vollzieht der eingesetzte Farbstoff Kresolrot Farbumschlag, der photometrisch messbar ist (Schilling, et al. 1993).

Messungen in Rohzelleextrakt von *E. coli*

Aus einer herkömmlichen Kultivierung transformierter *E. coli* BL21-Zellen, die jeweils einen der Biosensoren exprimierten, wurden die Zellen nach Standardkulturbedingungen durch Zentrifugation vom Kulturüberstand abgetrennt.

Die gewonnen Bakterienpellets wurden in Konzentrationen von 5 %, 10 % und 20 % (w/v) Biofeuchtmasse in MOPS Puffer resuspendiert und über Ultraschall gekühlt aufgeschlossen (**Abbildung 5-7**). Die Pellets wurden entsprechend des Zielexperiments direkt in dem jeweiligen Analysepuffer aufgeschlossen; also mit variierender Konzentration oder pH, da ein späteres Umpuffern nicht möglich war. Die Konzentration der exprimierten Sensoren im jeweiligen Rohzelleextrakt wurde über die spezifische Absorption der Akzeptormoleküle ermittelt.

Für die enzymatische Bestimmung des Zuckergehalts wurde ein kommerzielles Kit der Firma Roche verwendet (AMG/HK/G6P-DH; Bestellnummer: 127825.737275).

Einfluss intrazellulärer Komponenten

Es wurde der Einfluss diverser intrazellulärer Komponenten auf die Fluoreszenzeigenschaften der Biosensoren und isolierten Fluoreszenzproteine getestet. Hierzu wurden eine Reihe von Stocklösungen dieser Substanzen angesetzt. Dabei handelte es sich zum einen um ATP, ADP, AMP, NAD^+ , NADH, NADP^+ , NADPH, GTP und cGMP (**Tabelle 5-16**). Darüber hinaus wurden die Salzlösungen NaCl, CaCl_2 , MgCl_2 , KCl, NH_4Cl , MnCl_2 und NaP_i getestet (**Tabelle 5-17**).

Entsprechend des in **Abbildung 5-10** dargestellten Schemas wurde diese Analyse im Mikrotiterplattenmaßstab mit einem Endvolumen von 100 μL durchgeführt. Hierbei wurde die Konzentration des jeweiligen Biosensors bzw. isolierten Fluoreszenzproteins konstant gehalten (0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Darüber hinaus wurden 10 μL einer 1M Glucose-, bzw. Maltoselösung zugegeben (vgl. **Abbildung 5-10**, Reihe A+C). Als Kontrollansatz wurde, anstelle der Zuckerlösung die Messung mit 10 μL einer 20 mM MOPS Pufferlösung (pH 7,3) durchgeführt (vgl. **Abbildung 5-10**, Reihe B+D).

Einzig variiert wurde somit nur die Endkonzentration der zu untersuchenden Verbindung, wie aus der folgenden Abbildung deutlich wird (**Abbildung 5-10**, rote Ziffern).

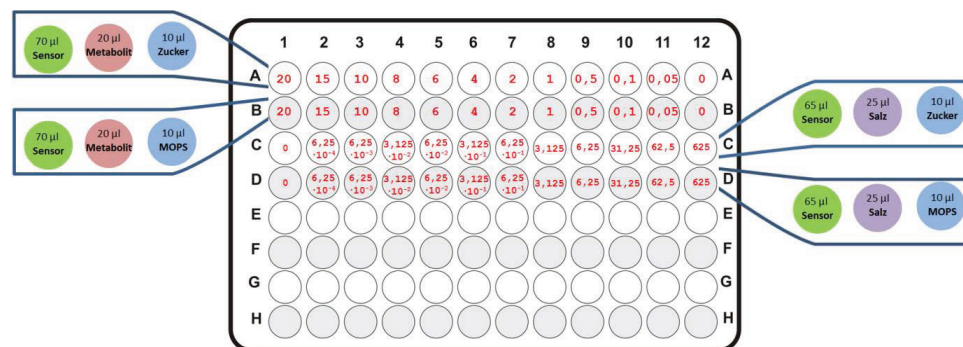


Abbildung 5-10: Schematische Darstellung des Pipettierschemas für die Untersuchung des Einflusses von intrazellulären Komponenten auf das Fluoreszenzsignal der Biosensoren und der isolierten Fluoreszenzproteine. Die Untersuchung wurde im Mikrotiterplattenmaßstab durchgeführt. Die roten Ziffern bezeichnen die Endkonzentration der intrazellulären Substanzen. Rechts und links von der Mikrotiterplatte ist die jeweilige Zusammensetzung der Ansätze beschrieben. Das Endvolumen betrug demnach immer 100 μL .

Alle Stoffe wurden auf Eigenfluoreszenz getestet, um eine Basislinienkorrektur durchführen zu können. Hierfür wurde jede Substanz in die eingesetzte Endkonzentration gebracht, wobei der Sensoranteil durch Puffer ersetzt wurde. Die Endkonzentration wurde somit ebenso vergleichbar gehalten, wie die Konzentrationsreihe der Substanzen.

Künstliche crowder

Um einen Einfluss von *molecular crowding* auf die Bindekinetiken der Biosensoren *in vitro* zu simulieren, wurden verschiedene *crowder* in Konzentrationen von 2,5 – 15 % (w/v) angesetzt. Als globulärer *crowder* wurde bovines Serumalbumin (66.500 Dalton) verwendet. Polyethylenglycol (2.000/5.000/10.000/20.000 Dalton) wurde als Vertreter für langkettigen *crowder* eingesetzt. Ficoll (70.000 Dalton) ist ein verzweigtes Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer und stellt eine Art

Übergang zwischen den *crowder*-Arten dar. Alle Stoffe wurden auf Eigenfluoreszenz getestet, um eine Basislinienkorrektur durchführen zu können. Hierfür wurde jede Substanz in die eingesetzte Endkonzentration gebracht, wobei der Sensoranteil durch Puffer ersetzt wurde. Die Endkonzentration wurde somit ebenso vergleichbar gehalten, wie die Konzentrationsreihe der Substanzen.

Abbildung 5-11 zeigt das grundlegende Pipettierschema für diese experimentelle Serie. Da vor allen Dingen der Einfluss auf den K_d -Wert untersucht werden sollte, war es nötig die standardmäßig verwendeten 24 Zuckerkonzentrationen zu verwenden, um die –für die K_d -Berechnung benötigten, S-Kurven zu erhalten (vgl. Abbildung 5-11, rote Ziffern [mM]). Abgesehen von dieser Verdünnungsreihe, wurde die Biosensorlösung ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) und die entsprechende Konzentration des *crowding agents* pro well zugegeben (**Abbildung 5-11**).

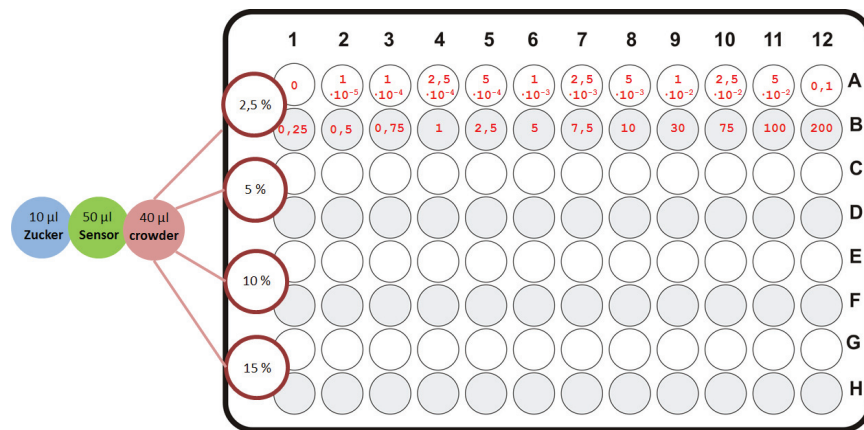


Abbildung 5-11: Schematische Darstellung des Pipettierschemas für die Untersuchung des Einflusses von *crowdern* auf das Fluoreszenzsignal der Biosensoren. Die Untersuchung wurde im Mikrotiterplattenmaßstab durchgeführt. Die roten Ziffern bezeichnen die Endkonzentration an Zuckerlösung (Maltose, Glucose). Links von der Mikrotiterplatte ist die jeweilige Zusammensetzung der Ansätze beschrieben. Das Endvolumen betrug demnach immer 100 µL. Die *crowding agents* wurden in Konzentrationen von 2,5 % - 15 % (w/v) eingesetzt. Ebenfalls wurde je Sensor ein Kontrollansatz mit 20 mM MOPS Puffer (pH 7,3) anstelle des *crowding agents* mitgeführt.

6 Anhang

MRGSHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPGRADTRIGVTIYKSAGMVSKEELFTGVVPILVELDGDVNG
HKFSVSGEGEDATYGLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTLTGVGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDD
GNYKTRAEVKFEGDGLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNIYSHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHYQ
QNTPIGDGVPVLLPDNHLYSTQSALS KDPNEKRDMVLLFVTAAGITLGMDELYGSRDNFMSVVRKAIEQDAKAAPD
VQLLMNDSQNDQSKQNDQIDVLLAKGVKALAINLVDPAAGTVIEKARGQNVPVVFNKEPSRKALDSYDKAYVVG
DSKESGIIQGDLIAKHWAANQGWDLNKGDIQFVLLKGEPHPDAEARTTYVIKELNDKGKTEQLQDLMWDTAQ
AKDKMDAWLSGPNANKIEVVIANNAMAMGAVEALKAHNKSIPVFGVDALPEALALVKSGALAGTVLNDANNQA
KATFDLAKNLADGKGAADGTNWKIDNKVVRVPYVGVDKDNLAEFSSKAGAGTGMVSKEELFTGVVPILVELDGDV
NGHKFSVSGEGEDATYGLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTLTGVYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFK
DDGNYKTRAEVKFEGDGLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNIYSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD
HYQNTPIGDGVPVLLPDNHLYSTQSALS KDPNEKRDMVLLFVTAAGITLGMDELYK

Blau = ECFP

Gelb = Citrine YFP

Schwarz = Glucose Bindedomäne

Grün = Linker

Abbildung 6-1: Glucosensor (MP18.1.1) kommentierte Proteinsequenz. Die farbliche Kodierung in der Sequenz entspricht der des darüber angeordneten Sensorschemas.

XbaI

... CCTCTAGATAATTTTGTAACTTTAAGAGGAGATATACATATGCGGGTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGACAGCAATGGGTGCGGA
TCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGGGCCGCGCTGATCTCGCATTTGGTGTAACTATATAAGTCGGCTGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGC
CCATCTCTGGTGTGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAGTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTTGAAGTTTCATCTGCACACCGGC
AAGCTGCCGTGCCGTGGCCACCTCGTGACCACTCGCTGCGGGCGTGCAGTCTTCAGCCGCTACCCGACCATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCGGCATGCCGGA
AGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATTCTTCAAGGACGACGGCACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCAGGGGCGACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCG
ACTTCAAGGAGGACGGCAACCTCTGGGCGACAGCTGGAGTACAACATACAGCCACACGCTCTATATCACCGCGCAAGCAGAGAACGGCATCAAGGCCAATCTCAAGATC
CGCCACAACATCGAGGAGGGCAGCGTGCAGCTGCGCGACCACTACAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTCTGCTGCCGCAACCACTACCTGAGCAGCCAGTCCGC
CCTGAGCAAGACCCCAACGAGAGCGCGATCACATGGTCTCTGGAGTTCGTGACCGCGCGCGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTATACGGTAGCCGAGATACTTTATGT
CTGTAGTGGCAAGGCTATTGAGCAAGATGCGAAGCCGCGCCAGATGTTCAAGTCTGATGAATGATTCTCAGATGACCAAGTCCAAGCAGAACGATCAGATCGACGTATTGCTG
GCGAAGGGGTGAAGGCACTGGCAATCAACCTGGTTGACCCGCGAGCTGCGGGTACGGTGATTGAGAAAGCGCGTGGGCAAAACGTGCCGTGGTCTTCTCAACAAAGAACCGTC
TCGTAAGGGCGTGGTAGTACGACAAAGCCTACTACGTTGGCACTGACTCCAAAGAGTCCGGCATTATTCAAGCGGATTGATTGCTAAACACTGGGCGCGCAATCAGGGTTGGG
ATCTGAACAAAGCGGTGAGATTGATTGCTGCTGAAAGGTGAACCGGGCCATCCGGATGCAGAACGACGTACCACTTACGTGATTAAAGAAATGAACGATAAAGGCATCAAA
ACTGAACAGTTACAGTTAGATACCGCAATGTGGACACCGCTCAGGCGAAAGATAAGATGGACGCTGGTGTCTGGCCGACGCAACAAATCGAAGTGGTTATCGCCAAACAA
CGATGCGATGGCAATGGGCGCGTTGAAGCGCTGAAAGCACCAACAGTCCAGCATTCGGTGTGGCGTGGATGCGCGTGGCAGGAGCGTGGCGTGGTGAATCCGGTGCAC
TGGCGGGCACCGTACTGACGATGTAACACCAAGCGCAAGCGACCTTTGATCTGGCGAAAGACCTGGCGATGTTAAAGTGGCGGTGATGGCACCACTGGAATCGGATCGACAAAC
AAGTGGTCCGCTACCTTATGTTGGCTAGATAAGACAACTGGTGAATTCAGCAAGAAAGCGCGGTACCGTGGAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGT
GGTGGCCATCTGGTGCAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAAGTTCAAGCTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTTCATCTGCACCA
CCGGCAAGCTGCCGTGCCGTGGCCACCTCTGTGACCACTCTCGGCTACGGCTGCTGCGCCGTACCCCGACCACTGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCCGCATG
CCCGAAGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCAGGGGCGACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG
CATCGACTTCAAGAGGACCGCAACATCTGGGGCAACGCTGAGTACAACATAACAGCCACACGCTTATATCATGCGCGACAGCAGAAACGGCATCAAGGTGAATCTCA
AGATCCGCGCAACATCGAGGAGCGCAGCTGCAGCTGCGCGACCACTACAGCAGAACACCCCATCGCGGACGGCCCGTGTGTGCTGCCGACAACTACCTGAGCTGAGCTACAG
TCCGCCGTGAGCAAGACCCCAAGAGCGCGATCACATGGTCTGTGGAGTTCGTGACCGCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAACTAATAC...

HindIII

Abbildung 6-2: Glucosensor (MP18.1.1) kommentierte Nukleotidsequenz. Angrenzende Standardschnittstellen für Klonierungen sind XbaI und HindIII.

MRGSHHHHHHGMASMTGGQMGRLDYYDDDDKDPGRMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSVEGEGDAT
 YGKLTLLKFICTGKLPVPWPTLVTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKEFEGT
 LVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNISHNVYTADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDN
 HYLSTQSALS KDPNEKRDMHVLLEFVTAAGIKIEEGKLVINGDKGYNGLAIEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEFPPQ
 VAATGDGPDIIIFWAHDFRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDVAVRYNGKLIAYPIAVEALSILYNKDLLPNPPKTW
 EEIPALDKELKAGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGKYDIKDVGVNAGAKAGLTLVDLIKNNHMNAD
 TDYSIAEAAFNKGETAMTIKGPAAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTD
 EGLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIPQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDA
 QTRITKLELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSVEGEGDATYGLTKLFICTTGKLPVPWPTLVTLTFYGLQCFARYPDHMK
 QHDFFSKAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEKDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNISHNVYIMADKQK
 NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDGHVLLPDNHYLSYQSALS KDPNEKRDMHVLLEFVTAAGITLGMDEL
 YK

Blau = ECFP Gelb = Citrine YFP Schwarz = Maltose Bindedomäne Grün = Linker

Abbildung 6-3: Maltosesensor (MP24) kommentierte Proteinsequenz. Die farbliche Kodierung in der Sequenz entspricht der des darüber angeordneten Sensorschemas.

BamHI

...AGGATCCGGGCGCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCTATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCCAAGTTACGCGTGT
 CGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCACTGCAACACCGGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACACCCCTGACCTGG
 GGCGTGCAGTCTTACGGCGCTACCGCGACCATGAAGCAGCAGCACTTCTCAAGTCCGCCATGCCGGAAGGCTACCTCCAGGAGCGGACCATCTTCTTCAAGGACG
 ACGGCACTACAAGACCGCGCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCTGGTAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCA
 CAAGCTGGAGTACAACATACATCAGCCACAAGCTTATATCACCGCGCACAGCAGAGAAGACGGCATCAAGGCCAATTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGC
 GTGCACTCGCGGACCATACAGCAGCAACACCCCATCGCGGACCGCGCGTGTCTGCTGCCGCAACCACTACCTGAGCAGCCAGTCCGCGCTGAGCAAGACCCCA
 ACGAGAAGCGCGATCACATGCTCTGCTGAGCTTCTGACCGCGCGCGGATCAAAATCGAAGAAGTAACTGGTAATCTGGATTACCGCGATAAAGCTATAACGG
 TCTCGCTGAAGTCGTTAAGAAATTCGAGAAGATACCGGAATTAAGTCACCGTTGAGCATCCGGATAAACTGGAAGAGAAATCCACAGGTTGGCGCACTTGGCGAT
 GGCCCTGACATTATCTTCTGGGCACACGACCGCTTGGTGGCTACCGCTCAATCTGGCGCTGTGGCTGAAATCACCCCGGACAAAGCGTCCAGGACAAAGCTGTATCGGT
 TTACCTGGGATGCGCTACGTTACAAACGGCAAGCTGATTGCTTACCGGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTATACAAAGATCTGCTGCCGAACCGGCCAAAAAC
 CTGGGAAGAGATCCCGCGCTGGATAAAGAACTGAAAGCGAAGGTAAGAGCGCGCTGATGTTCAACTGCAAGAACCTACTTCACTGGCGCTGATTGCTGCTGAC
 GGGGTTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGCAAGTACGACATTAAAGACGTGGCGCTGGATAACGCTGGCGCGAAGCGGCTGACCTTCTGGTTGACCTGATTAAAA
 ACAAACACATGAATCGACACACCGATTACTCCATCGCAGAAGCTGCCCTTAATAAAGCGCAACAGCGATGACCATCAAGGGCCCGCGGCTGTTCAACATCGACAC
 CAGCAAGTGAATTATGGTAAACGCTACTGCCGACCTTCAAGGGTCAACCATCCAAACCGTTCTGTTGGCGTGTGAGCGCAGGTATTAAACGGCGCCAGTCCGAACAA
 GAGCTGGCGAAGAGTCTCTGAAAATCTATGCTGACTGATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCTGGGTGCGGTAGCGCTGAAGTCTTACGAGGAAG
 AGTTGGCGAAGATCCACGTTATGCGCCACCATGGAAAACGCCAGAAAGTGAATCATGCCGAACATCCCGAGATGTCGCGCTTCTGTTGATGCGGTGCTACTGTC
 GGTGATCAACCGCGCGCGTCTGAGATGTCGATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAGACTCGTATCACCAAGCTCGAGCTGTTCAACCGGGTGGTGGCCATCTGGTC
 GAGCTGGACGGCGAGTAAACGGCCACAAGTTCAAGCTGTCCGGCGAGGGCGAGGCGGATGCCACTACGCCAAGCTGACCTGAAGTTCACTGTCACACCGCGCAAGC
 TGCCCGTGCCTTGGCCACCCCTCGTGACCACTTGGCTAGCGCTGCAAGTCTTGGCCGCTACCCCGACCATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCGATGCC
 CGAAGGCTACGTCAGGAGCGCACCATCTTCTCAAGGACGACGGCACTACAAGACCGCGCGAGGTGAAGTTGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTG
 AAGGGCATCGACTTCAAGGAGACGGCAACATCTCGGGGCAAGCTGGAGTACAACATCAACAGCCACAAGCTTATATCATGGCCGACAAAGCAGAAGACGGCATCA
 AGGTGAATTCAGATCCGCGACAACTCGAGGACGGCAGCTGCAAGCTCGCCGACCACTACAGCAGAACACCCCATCGCGGACGGCCAGCTGCTGCTGCCGACAA
 CCATCACTGAGCTACCACTCGCCCTGAGCAAGACCCCAACGAGAAGCGGATCACATGCTGCTGGAGTTCTGACCGCGCGCGGATCACTCTCGGCGATGGAC
 GAGCTGACAGTAAGCTTATCC...

HindIII

Abbildung 6-4: Maltosesensor (MP24) kommentierte Nukleotidsequenz. Angrenzende Standardschnittstellen für Klonierungen sind BamHI und HindIII.

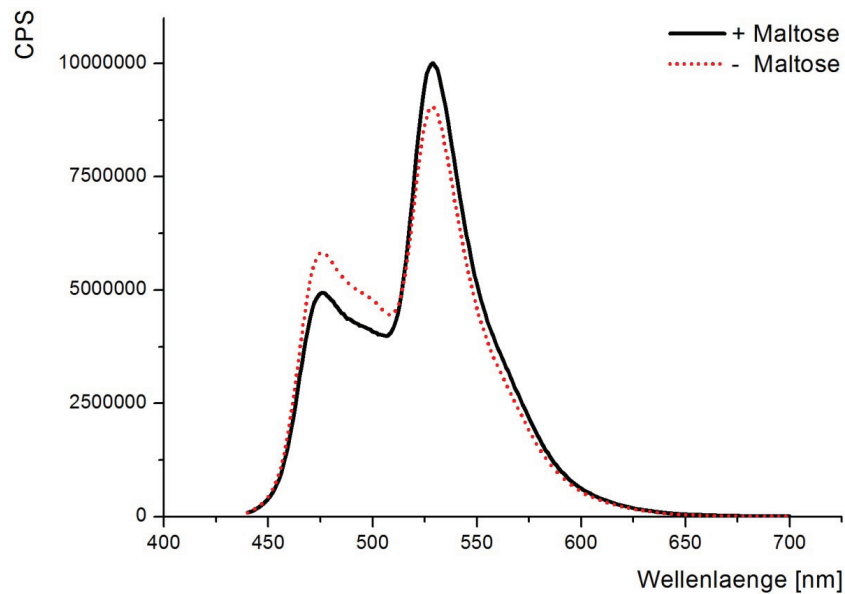


Abbildung 6-5: Emissionsspektrum des Maltosesensors in 20 mM MOPS (pH 7,3) bei $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach Anregung bei 428 nm in An- und Abwesenheit von 100 mM Maltose. Gut zu erkennen ist die Doppelbande der ECFP-Komponente bei 485 nm und 505 nm und die Abnahme des Donors in Anwesenheit des Zuckers.

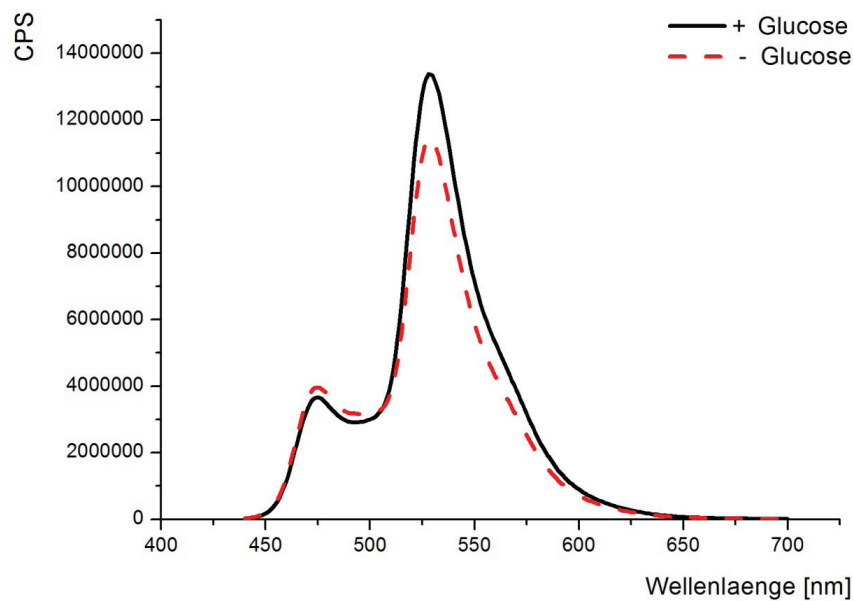


Abbildung 6-6: Emissionsspektrum des Glucosesensors in 20 mM MOPS (pH 7,3) bei $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach Anregung bei 428 nm in An- und Abwesenheit von 100 mM Glucose. Die Doppelbande der ECFP-Komponente bei 485 nm und 505 nm lässt sich hier nicht erkennen, jedoch ebenfalls die Abnahme des Donors in Anwesenheit des Zuckers.

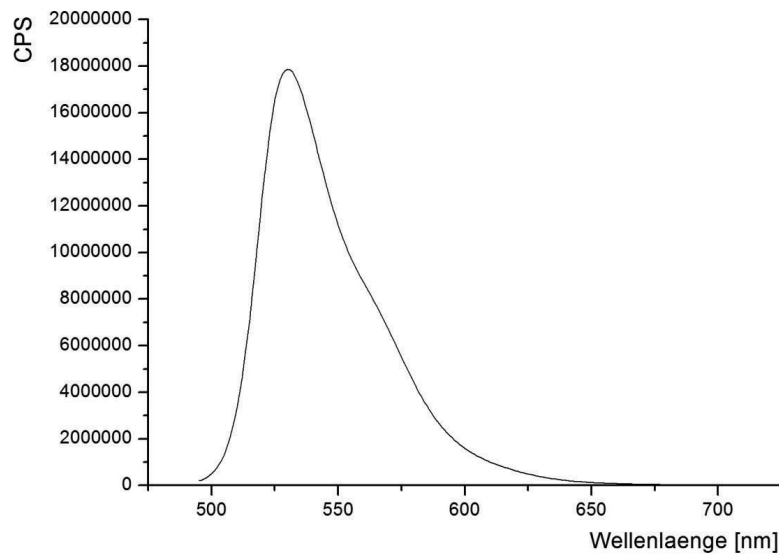


Abbildung 6-7: Emissionsspektrum von Citrine in 20 mM MOPS (pH 7,3) bei $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach Anregung bei 485 nm.

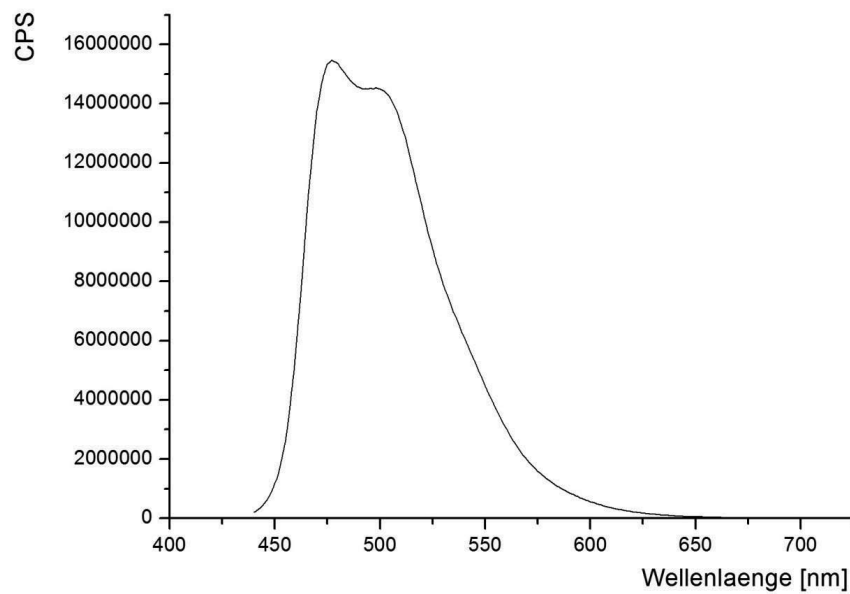


Abbildung 6-8: Emissionsspektrum von ECFP in 20 mM MOPS (pH 7,3) bei $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach Anregung bei 428 nm.

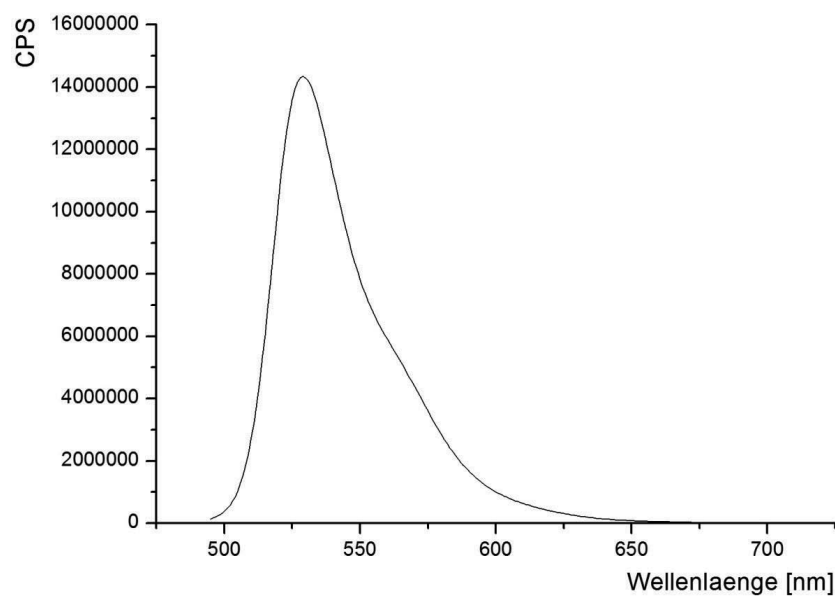


Abbildung 6-9: Emissionsspektrum von EYFP in 20 mM MOPS (pH 7,3) bei $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach Anregung bei 485 nm.

7 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich in meiner Arbeit keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entlehnt sind, wurden durch die Angabe ihrer Quellen kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift

Wissenschaftlicher Lebenslauf

Promotion

05/2009 – 05/2012 Promotion am Institut für Bio- und Geowissenschaften (IBG-1: Biotechnologie) des Forschungszentrums Jülich.

Thema der Promotion: Eine kritische Evaluierung FRET-basierter Biosensoren als Werkzeuge für die quantitative Metabolitanalytik

Master of Science

10/2006 – 04/2009 Studium der Molekularen Biotechnologie an der RWTH Aachen.

Die Masterarbeit mit dem Thema „Reaktionstechnische Untersuchungen zu Ganzzellbiotransformationen von Steroiden mit rekombinanter *S. pombe*“, wurde am Institut für Bio- und Geowissenschaften des Forschungszentrums Jülich durchgeführt.

Bachelor of Science

10/2003 – 07/2006 Studium der Bioinformatik und Genomforschung an der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld mit dem Abschluss Bachelor of Science.

Die Bachelorarbeit: „Graphenbasierte Analyse und Visualisierung von genregulatorischen Netzwerken“, wurde im Rahmen des CoryneRegNet-Projekts durchgeführt (<http://coryneregnet.cebitec.uni-bielefeld.de>).

Publikationsliste

Moussa R, Baierl A, Steffen V, Kubitzki T, Wiechert W, Pohl M. (2012). *“A critical evaluation of genetically encoded FRET-based biosensors for quantitative metabolite analyses in vivo.” (in prep).*

Moussa R, Baierl A, Wiechert W, Pohl M. *“Evaluation of genetically encoded FRET-biosensors as tools for quantitative metabolome analysis”* Biotrans 2011 - Conference of Industrial process research & development, Giardini Naxos (ME), Italy, October 2–6.10.2011.

Moussa R, Wiechert W, Pohl M. *„Enzym-Toolboxen liefern bioaktive Moleküle als Wirkstoffe für die Medizin“* 2. Jahreskongress im Rahmen des Strategieprozesses: Nächste Generation biotechnologischer Verfahren, Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), 7. Juli 2011, Berlin, Deutschland.

8 Literaturverzeichnis

- ANJEM, A., et al. (2009). "Manganese import is a key element of the OxyR response to hydrogen peroxide in *Escherichia coli*." Molecular Microbiology **72**(4): 844-858.
- BADER, J. E., et al. (2004). "Fluorescence Resonance Energy Transfer to Study Receptor Dimerization in Living Cells." Methods in Molecular Biology **259**(2): 335-352.
- BAIERL, A. (2011). "Evaluierung FRET-basierter Biosensoren als Werkzeuge für die quantitative Metabolitanalytik.", Bachelorarbeit Fachhochschule Aachen, Jülich: 1-82.
- BENNETT, B. D., et al. (2009). "Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*." Nature Chemical Biology **5**(8): 593-599.
- BERMEJO, C., et al. (2011). "Optical sensors for measuring dynamic changes of cytosolic metabolite levels in yeast." Nature Protocols **6**(11): 1806-1817.
- BJORKMAN, A. J., et al. (1994). "Probing Protein-Protein Interactions - the Ribose-Binding Protein in Bacterial Transport and Chemotaxis." Journal of Biological Chemistry **269**(48): 30206-30211.
- BJORKMAN, A. J., et al. (1998). "Multiple open forms of ribose-binding protein trace the path of its conformational change." Journal of Molecular Biology **279**(3): 651-664.
- BONANNO, L. M., et al. (2007). "Steric crowding effects on target detection in an affinity biosensor." Langmuir **23**(10): 5817-5823.
- BORROK, M. J., et al. (2007). "Conformational changes of glucose/galactose-binding protein illuminated by open, unliganded, and ultra-high-resolution ligand-bound structures." Protein science **16**(6): 1032-1041.
- BORST, J. W., et al. (2010). "ATP Changes the Fluorescence Lifetime of Cyan Fluorescent Protein via an Interaction with His148." Public Library of Science One **5**(11).
- BRADFORD, M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**: 248-254.
- BURZ, D. S., et al. (2009). "Structural Biology: Inside the Living Cell." Nature **458**(7234): 37-38.
- CHALFIE, M. (2009). "GFP: lighting up life (Nobel Lecture)." Angewandte Chemie **48**(31): 5603-5611.

- CHALFIE, M., et al. (1994). "Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene-Expression." Science **263**(5148): 802-805.
- CHEBOTAREVA, N. A., et al. (2004). "Biochemical effects of molecular crowding." Biochemistry-Moscow **69**(11): 1239-1244.
- CONOVER, W. (1998). "Buffer Solutions: The Basics (Beynon, R. J.; Easterby, J. S.)." Journal of Chemical Education **75**(2): 153.
- COONS, A. H., et al. (1942). "The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody." Journal of Immunology **45**(3): 159-170.
- CUBITT, A. B., et al. (1995). "Understanding, Improving and Using Green Fluorescent Proteins." Trends in Biochemical Sciences **20**(11): 448-455.
- DALE, R. E., et al. (1979). "The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer." Biophysical Journal **26**(2): 161-193.
- DATTELBAUM, J. D. (2010). "Genetically Engineered Proteins as Recognition Receptors." Recognition Receptors in Biosensors. ZOUROB, M., Springer New York: 531-563.
- DEUSCHLE, K., et al. (2005). "Construction and optimization of a family of genetically encoded metabolite sensors by semirational protein engineering." Protein Science **14**(9): 2304-2314.
- DREPPER, T., et al. (2007). "Reporter proteins for in vivo fluorescence without oxygen." Nature Biotechnology **25**(4): 443-445.
- DREPPER, T., et al. (2010). "Flavin mononucleotide-based fluorescent reporter proteins outperform green fluorescent protein-like proteins as quantitative in vivo real-time reporters." Applied and Environmental Microbiology **76**(17): 5990-5994.
- DWYER, M. A., et al. (2004). "Periplasmic binding proteins: a versatile superfamily for protein engineering." Current Opinion in Structural Biology **14**(4): 495-504.
- ELLIS, R. J. (2001). "Macromolecular crowding: obvious but underappreciated." Trends in Biochemical Sciences **26**(10): 597-604.
- ELLIS, R. J., et al. (2003). "Cell biology - Join the crowd." Nature **425**(6953): 27-28.

- ELOWITZ, M. B., et al. (1999). "Protein mobility in the cytoplasm of *Escherichia coli*." Journal of Bacteriology **181**(1): 197-203.
- FEHR, M., et al. (2002). "Visualization of maltose uptake in living yeast cells by fluorescent nanosensors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(15): 9846-9851.
- FELDER, C. B., et al. (1999). "The Venus flytrap of periplasmic binding proteins: an ancient protein module present in multiple drug receptors." American Association of Pharmaceutical Scientists **1**(2): E2.
- FORSTER, T. (1959). "10th Spiers Memorial Lecture - Transfer Mechanisms of Electronic Excitation." Discussions of the Faraday Society **1**(27): 7-17.
- FÖRSTER, T. (1948). "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz." Annalen der Physik **437**(1-2): 55-75.
- GARRETT, J. R., et al. (2008). "pH-Insensitive Glucose Indicators." Biotechnology Progress **24**(5): 1085-1089.
- GOINS, A. B., SANABRIA, H., et al. (2008). "Macromolecular crowding and size effects on probe microviscosity." Biophysical Journal **95**(11): 5362-5373.
- GOODSELL, D. S. (1991). "Inside a Living Cell." Trends in Biochemical Sciences **16**(6): 203-206.
- GRIESBECK, O., et al. (2001). "Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein - Mechanism and applications." Journal of Biological Chemistry **276**(31): 29188-29194.
- GRUNEWALD, K., et al. (2003). "Prospects of electron cryotomography to visualize macromolecular complexes inside cellular compartments: implications of crowding." Biophysical Chemistry **100**(1-3): 577-591.
- HALL, D., et al. (2003). "Macromolecular crowding: qualitative and semiquantitative successes, quantitative challenges." Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics **1649**(2): 127-139.
- HALL, D., et al. (2004). "Effects of inert volume-excluding macromolecules on protein fiber formation. II. Kinetic models for nucleated fiber growth." Biophysical Chemistry **107**(3): 299-316.
- HAN, M. J., et al. (2006). "The *Escherichia coli* proteome: past, present, and future prospects." Microbiology and molecular biology reviews : MMBR **70**(2): 362-439.

- HANAHAN, D. (1983). "Studies in transformation of *Escherichia coli* with plasmids." Journal of Molecular Biology **166**(4): 557- 580.
- HARTL, F. U. (1996). "Molecular chaperones in cellular protein folding." Nature **381**(6583): 571-580.
- HEIM, R., et al. (1995). "Improved green fluorescence." Nature **373**(6516): 663-664.
- HEIM, R., et al. (1994). "Wavelength Mutations and Posttranslational Autoxidation of Green Fluorescent Protein." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(26): 12501-12504.
- HOU, B. H., et al. (2011). "Optical sensors for monitoring dynamic changes of intracellular metabolite levels in mammalian cells." Nature Protocols **6**(11): 1818-1833.
- HURWITZ, C., et al. (1967). "Intracellular Concentration of Bound and Unbound Magnesium Ions in *Escherichia Coli*." Journal of Biological Chemistry **242**(16): 3719-3726.
- INOUE, S., et al. (1994). "Evidence for Redox Forms of the *Aequorea* Green Fluorescent Protein." Federation of European Biochemical Societies Letters **351**(2): 211-214.
- JABLONSKI, A. (1935). "About the mechanism of photo-luminescence of dye phosphors." Zeitschrift Für Physik **94**(1-2): 38-46.
- JASNIN, M., et al. (2008). "In Vivo Measurement of Internal and Global Macromolecular Motions in *Escherichia coli*." Biophysical Journal **95**(2): 857-864.
- KAHN, K., et al. (2010). "Principles of Biomolecular Recognition." Recognition Receptors in Biosensors. ZOUBO, M., Springer New York: 3-45.
- KEES, L. E. A. (2001). "Purification of his-tagged proteins by immobilized chelate affinity chromatography; the benefits from the use of organic solvent." Protein Expression and Purification **18**(1): 95-99.
- KUMARAN, S., et al. (2000). "An enigmatic peptide ligation reaction: Protease-catalyzed oligomerization of a native protein segment in neat aqueous solution." Protein Science **9**(4): 734-741.
- LAKOWICZ, J. R. (2006). "Principles of fluorescence spectroscopy". New York, Springer.
- LÄMMLI, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4." Nature **227**(5259): 680-685.

- LO, C. J., et al. (2006). "Fluorescence measurement of intracellular sodium concentration in single *Escherichia coli* cells." Biophysical Journal **90**(1): 357-365.
- MCSHANE, M., et al. (2009). "Fluorescence-Based Glucose Sensors." In vivo glucose sensing, Wiley-Blackwell, New York: 269-316.
- MEDALIA, O., et al. (2002). "Macromolecular Architecture in Eukaryotic Cells Visualized by Cryoelectron Tomography." Science **298**(5596): 1209-1213.
- MINTON, A. P. (1983). "The Effect of Volume Occupancy Upon the Thermodynamic Activity of Proteins - Some Biochemical Consequences." Molecular and Cellular Biochemistry **55**(2): 119-140.
- MINTON, A. P. (2001). "The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media." Journal of Biological Chemistry **276**(14): 10577-10580.
- MIYAWAKI, A., et al. (1997). "Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin." Nature **388**(6645): 882-887.
- NEWMAN, R. H., et al. (2011). "Genetically Encodable Fluorescent Biosensors for Tracking Signaling Dynamics in Living Cells." Chemical Reviews **111**(5): 3614-3666.
- PATTERSON, G. H., et al. (2000). "Forster distances between green fluorescent protein pairs." Analytical Biochemistry **284**(2): 438-440.
- PING, G., et al. (2004). "Studies of effects of macromolecular crowding and confinement on protein folding and protein stability." Journal of Molecular Recognition **17**(5): 433-440.
- PHILLIP, Y., et al. (2009). "Common crowding agents have only a small effect on protein-protein interactions." Biophysical Journal **97**(3): 875-885.
- O'CONNOR DV, PHILLIPS D. (1984). *Time-correlated single-photon counting*. Academic Press, New York.
- QUIOCHO, F. A., et al. (1997). "Extensive features of tight oligosaccharide binding revealed in high-resolution structures of the maltodextrin transport chemosensory receptor." Structure **5**(8): 997-1015.
- QUIOCHO, F. A., et al. (1984). "Novel Stereospecificity of the L-Arabinose-Binding Protein." Nature **310**(5976): 381-386.

- RALSTON, G. B. (1990). "Effects of Crowding in Protein Solutions." Journal of Chemical Education **67**(10): 857-860.
- RIZZO, M. A., et al. (2004). "An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET." Nature Biotechnology **22**(4): 445-449.
- SACK, J. S., et al. (1989). "Periplasmic Binding-Protein Structure and Function - Refined X-Ray Structures of the Leucine Isoleucine Valine-Binding Protein and Its Complex with Leucine." Journal of Molecular Biology **206**(1): 171-191.
- SCHILLING, K. et al. (1993). "Multiwavelength photometry of thermochromic indicator solutions for temperature determination in multicuvettes." Clinical chemistry **39** (2), 251.
- SHABALA, L., et al. (2009). "Ion transport and osmotic adjustment in *Escherichia coli* in response to ionic and non-ionic osmotica." Environmental Microbiology **11**(1): 137-148.
- SHARFF, A. J., et al. (1992). "Crystallographic Evidence of a Large Ligand-Induced Hinge-Twist Motion between the 2 Domains of the Maltodextrin Binding-Protein Involved in Active-Transport and Chemotaxis." Biochemistry **31**(44): 10657-10663.
- SHIMOMURA, O. (1979). "Structure of the Chromophore of *Aequorea* Green Fluorescent Protein." Federation of European Biochemical Societies Letters **104**(2): 220-222.
- SHIMOMURA, O. (2009). "Discovery of green fluorescent protein (GFP) (Nobel Lecture)." Angewandte Chemie **48**(31): 5590-5602.
- SHIMOMURA, O., et al. (1962). "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*." Journal of cellular and comparative physiology **59**(3): 223-239.
- SPURLINO, J. C., et al. (1991). "The 2.3-A resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis." The Journal of biological chemistry **266**(8): 5202-5219.
- STOKES, G. G. (1853). "On the Change of Refrangibility of Light and the exhibition thereby of the Chemical Rays." Mathematical and Physical Papers of Cambridge University Press **4**(1)22-29.
- STROHHOFER, C., et al. (2011). "Quantitative analysis of energy transfer between fluorescent proteins in CFP-GBP-YFP and its response to Ca^{2+} ." Physical Chemistry Chemical Physics **13**(39): 17852-17863.

- TSIEN, R. Y. (1998). "*The green fluorescent protein.*" Annual Review of Biochemistry **67**(1): 509-544.
- TSIEN, R. Y. (2009). "*Constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox (Nobel Lecture).*" Angewandte Chemie **48**(31): 5612-5626.
- VAN DEN BERG, B., et al. (1999). "*Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation.*" European Molecular Biology Organization Journal **18**(24): 6927-6933.
- VERMERSCH, P. S., et al. (1991). "*Sugar-Binding and Crystallographic Studies of an Arabinose-Binding Protein Mutant (Met108leu) That Exhibits Enhanced Affinity and Altered Specificity.*" Biochemistry **30**(28): 6861-6866.
- VYAS, N. K., et al. (1987). "*A novel calcium binding site in the galactose-binding protein of bacterial transport and chemotaxis.*" Nature **327**(6123): 635-638.
- WATKINS, N. J., et al. (1995). "*Free Calcium Transients in Chemotactic and Non-Chemotactic Strains of Escherichia-Coli Determined by Using Recombinant Aequorin.*" Biochemical Journal **306**: 865-869.
- YANG, F., et al. (1996). "*The molecular structure of green fluorescent protein.*" Nature Biotechnology **14**(10): 1246-1251.
- ZHANG, J., et al. (2002). "*Creating new fluorescent probes for cell biology.*" Nature Reviews Molecular Cell Biology **3**(12): 906-918.
- ZHOU, H. X., et al. (2008). "*Macromolecular crowding and confinement: Biochemical, biophysical, and potential physiological consequences.*" Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure **37**: 375-397.
- ZIMMERMAN, S. B., et al. (1993). "*Macromolecular Crowding - Biochemical, Biophysical, and Physiological Consequences.*" Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure **22**: 27-65.
- ZIMMERMAN, S. B., et al. (1991). "*Estimation of Macromolecule Concentrations and Excluded Volume Effects for the Cytoplasm of Escherichia-Coli.*" Journal of Molecular Biology **222**(3): 599-620.

1. **Methoden zur integrierten Analyse metabolischer Netzwerke unter stationären und instationären Bedingungen**
von S. A. Wahl (2008), 245 Seiten
ISBN: 978-3-89336-506-7
2. **Strukturelle Untersuchungen an membranassoziierten Proteinen: NMR-Strukturen des HIV-1 Virus Protein U (39-81) und des humanen CD4 (372-433)**
von M. Wittlich (2008), XVIII, 185 Seiten
ISBN: 978-3-89336-510-4
3. **Identifizierung von physiologischen und artifiziellen Liganden von GA-BARAP und Charakterisierung der resultierenden Interaktionen**
von J. Mohrlüder (2008), V, 158 Seiten
ISBN: 978-3-89336-511-1
4. **Struktur und Funktion von Transaminasen aus *Corynebacterium glutamicum***
von J. Marienhagen (2008), VI, 154 Seiten
ISBN: 978-3-89336-512-8
5. **Implementierung eines Funk-Protokolls (IEEE 802.15.4) und Entwicklung eines adaptiven Zeitsynchronisationsverfahrens für ein Netzwerk intelligenter und autarker Sensoren**
von M. Schlösser (2008), 77 Seiten
ISBN: 978-3-89336-519-7
6. **Etablierung und Optimierung der sekretorischen Gewinnung thermostabiler Lipasen in Gram-positiven Bakterien**
von H. Brundiek (2008), VIII, 154 Seiten
ISBN: 978-3-89336-520-3
7. **Visuospatial Attention: Neural Correlates and Pharmacological Modulation in Healthy Subjects and Patients with Spatial Neglect**
by S. Vossel (2008), XIV, 176 pages
ISBN: 978-3-89336-526-5
8. **Analyse des Substratspektrums der ClpCP-Protease aus *Corynebacterium glutamicum***
von J.-E. Schweitzer (2008), V, 130 Seiten
ISBN: 978-3-89336-528-9
9. **Adaptive Verfahren zur automatischen Bildverbesserung kernspintomographischer Bilddaten als Vorverarbeitung zur Segmentierung und Klassifikation individueller 3D-Regionen des Gehirns**
von J. Castellanos (2008), VI, 100 Seiten
ISBN: 978-3-89336-539-5

10. **Posttranslationale Regulation der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase in *Corynebacterium glutamicum***
von C. Schultz (2009), VII, 151 Seiten
ISBN: 978-3-89336-560-9
11. **MtrA, ein bifunktionaler Antwortregulator aus *Corynebacterium glutamicum***
von M. Brocker (2009), VI, 125 Seiten
ISBN: 978-3-89336-561-6
12. **Strukturelle Charakterisierung von GABRAP-Ligand-Interaktionen**
von Y. Thielmann (2009), 166 Seiten (getr. pag.)
ISBN: 978-3-89336-563-0
13. **Acceleration on an image reconstruction algorithm for Positron Emission Tomography using a Graphics Processing Unit**
by T. Felder (2009), 97 pages
ISBN: 978-3-89336-566-1
14. **NMR-Lösungsstruktur der Loopregion Tyr⁶⁷ - Leu⁷⁷ des visuellen Arrestins im Komplex mit photoaktiviertem Rhodopsin**
von S. Feuerstein (2009), XVI, 140 Seiten
ISBN: 978-3-89336-571-5
15. **Development of a Process for the Cleavage of a Mucin Fusion Protein by Enterokinase**
by T. Kubitzki (2009), IV, 133 pages
ISBN: 978-3-89336-575-3
16. **Children's health and RF EMF exposure**
project coord. P. Wiedemann (2009), 49 pages
ISBN: 978-3-89336-594-4
17. **Entwicklung einer Signalerfassungselektronik für eine Halbleiter-Photomultiplier (SiPM) Matrix**
von C. Parl (2009), IV, 128 Seiten
ISBN: 978-3-89336-595-1
18. **Medienorientierung biomedizinischer Forscher im internationalen Vergleich**
Die Schnittstelle von Wissenschaft & Journalismus und ihre politische Relevanz
herausg. von H. P. Peters (2009), 364 Seiten
ISBN: 978-3-89336-597-5
URN: urn:nbn:de: 0001-00542

19. **Identifizierung von Interaktionspartnern für HIV-1 Nef und ihre potentielle Relevanz bei der Entwicklung der HIV-assoziierten Demenz**
von J. Mötter (2010), VI, 172 Seiten
ISBN: 978-3-89336-604-0
20. **Biotransformationen mit Cytochrom P450 Monooxygenasen**
von D. Zehentgruber (2010), XI, 147 Seiten
ISBN: 978-3-89336-605-7
21. **Studies on central carbon metabolism and respiration of *Gluconobacter oxydans* 621H**
by T. Hanke (2010), 120 pages
ISBN: 978-3-89336-607-1
22. **Prozessentwicklung zur Produktion von 2-Keto-L-Gulonsäure, einer Vitamin C- Vorstufe**
von B. Osterath (2010), XXI, 213 Seiten
ISBN: 978-3-89336-612-5
23. **Visuell evozierte Antworten der corticalen Areale V1/V2 und V5/MT nach Schachbrettmusterumkehrreizung – Magnetenzecephalographische Untersuchungen in Kombination mit cytoarchitektonischen Wahrscheinlichkeitskarten**
von B. U. Barnikol (2010), III, 138 Seiten
ISBN: 978-3-89336-615-6
24. **Biochemische und regulatorische Analyse des TCA-Zyklus und Glyoxylat-Shunts in *Escherichia coli***
von M. Kunze (2010), 191 Seiten
ISBN: 978-3-89336-620-0
25. **Metabolomanalyse als Grundlage für ¹³C-Stoffflussanalyse und dynamischer Modellierung am Beispiel der Lysinbiosynthese**
von M. G. Wellerdiek (2010), xvi, 182 Seiten
ISBN: 978-3-89336-621-7
26. **Neue Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme für die Synthese enantiokomplementärer 2-Hydroxyketone**
von G. Kolter (2010), IX, 168 Seiten
ISBN: 978-3-89336-626-2
27. **Genetische Analyse von Substrat-Translokase-Wechselwirkungen bei der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *Escherichia coli***
von F. Lausberg (2010), 174 Seiten
ISBN: 978-3-89336-628-6
28. **Silicium Nanodrähte für die extrazelluläre Ableitung elektrischer Aktivität**
von J. F. Eschermann (2010), xii, 191 Seiten
ISBN: 978-3-89336-639-2

29. **Causality measures between neural signals from invasively and non-invasively obtained local field potentials in humans**
by E. Florin (2010), xxix, 220 pages
ISBN: 978-3-89336-646-0
30. **Regulatory and metabolic aspects of the phosphate starvation response of *Corynebacterium glutamicum***
by H. M. Woo (2010), III, 111 pages
ISBN: 978-3-89336-664-4
31. **Ligand interaction analysis of membrane-anchored proteins**
by J. Glück (2010) VIII, 87 pages (getr. pag.)
ISBN: 978-3-89336-683-5
32. **Novel insights into characteristics, relevance, and regulation of corynebacterial aconitase**
by M. Baumgart (2010), V, 147 pages
ISBN: 978-3-89336-682-8
33. **Investigation of GABARAP complexes with apoptosis-related proteins and structural characterization of GABARAP lipidation**
by P. Ma (2011), VI, 139 pages (getr. pag.)
ISBN: 978-3-89336-699-6
34. **GABARAP-artige Proteine, Nix und Bcl-2: Strukturelle Basis molekularer Interaktionen an der Schnittstelle zwischen Autophagie und Apoptose**
von M. Schwarten (2011), VIII, 164 Seiten (getr. pag.)
ISBN: 978-3-89336-700-9
35. **Einflussfaktoren auf die Stabilität und Aktivität der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* in Carboligasereaktionen mit aromatischen Aldehyden**
von M. Schwarz (2011), XI, 176 Seiten
ISBN: 978-3-89336-701-6
36. **Untersuchungen zur Bildung von D-Aminosäuren mit *Corynebacterium glutamicum***
von N. C. Stäbler (2011), VIII, 104 Seiten
ISBN: 978-3-89336-702-3
37. **Charakterisierung von Wirkstoffen für die Diagnose und Therapie von Morbus Alzheimer**
von D. Bartnik (2011), XII, 105 Seiten
ISBN: 978-3-89336-703-0
38. **Identifizierung und Charakterisierung von Regulatoren der Acyl-CoA Carboxylasen in *Corynebacterium glutamicum***
von J. Nickel (2011), IV, 127 Seiten
ISBN: 978-3-89336-712-2

39. **Metabolische ^{13}C -Stoffflussanalyse vom isotopisch stationären zum instationären Fall**
von K. Grönke (2011), getr. pag.
ISBN: 978-3-89336-713-9
40. **Enzyme supported crystallization of chiral amino acids**
by K. Würges (2011), XI, getr. pag.
ISBN: 978-3-89336-715-3
41. **Systemische Analyse des Citratzyklus in *Corynebacterium glutamicum***
von J. van Ooyen (2011), 116 Seiten
ISBN: 978-3-89336-731-3
42. **Einfluss intrazellulärer Nukleotid-Cofaktoren auf Redoxreaktionen in rekombinanten Ganzellsystemen**
von D. Minör (2011), XII, 138 Seiten
ISBN: 978-3-89336-737-5
43. **Development of ^{18}F -labelled radioligands for molecular imaging of the dopamine D4 receptor**
by F. Kügler (2011), xiv, 161 pages
ISBN: 978-3-89336-738-2
44. **Personalisierte Medizin im Gesundheitssystem der Zukunft. Einflussfaktoren und Szenarien**
von C.R. Karger, B. Hüsing (2011), viii, 99 Seiten
ISBN: 978-3-89336-743-6
45. **Charakterisierung von Proteinen einer neuartigen Signaltransduktionskaskade in *Corynebacterium glutamicum***
von G. Bosco (2011), V, 128 Seiten
ISBN: 978-3-89336-754-2
46. **CopRS and CsoR: two regulatory systems involved in copper homeostasis of *Corynebacterium glutamicum***
by S. V. Schelder (2012), IV, 90 pages
ISBN: 978-3-89336-761-0
47. **Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for efficient succinate production**
by B. O. Litsanov (2012), III, 105 pages
ISBN: 978-3-89336-762-7
48. **Der Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex in *Corynebacterium glutamicum* und seine Interaktion mit Odhl**
von K. Raasch (2012), VI, 86 Seiten
ISBN: 978-3-89336-764-1

49. **Signaltransduktion in *Corynebacterium glutamicum*:**
Studien zur Rolle von Proteinen mit einer FHA-Domäne
von S. Krawczyk (2012), 125 Seiten
ISBN: 978-3-89336-771-9

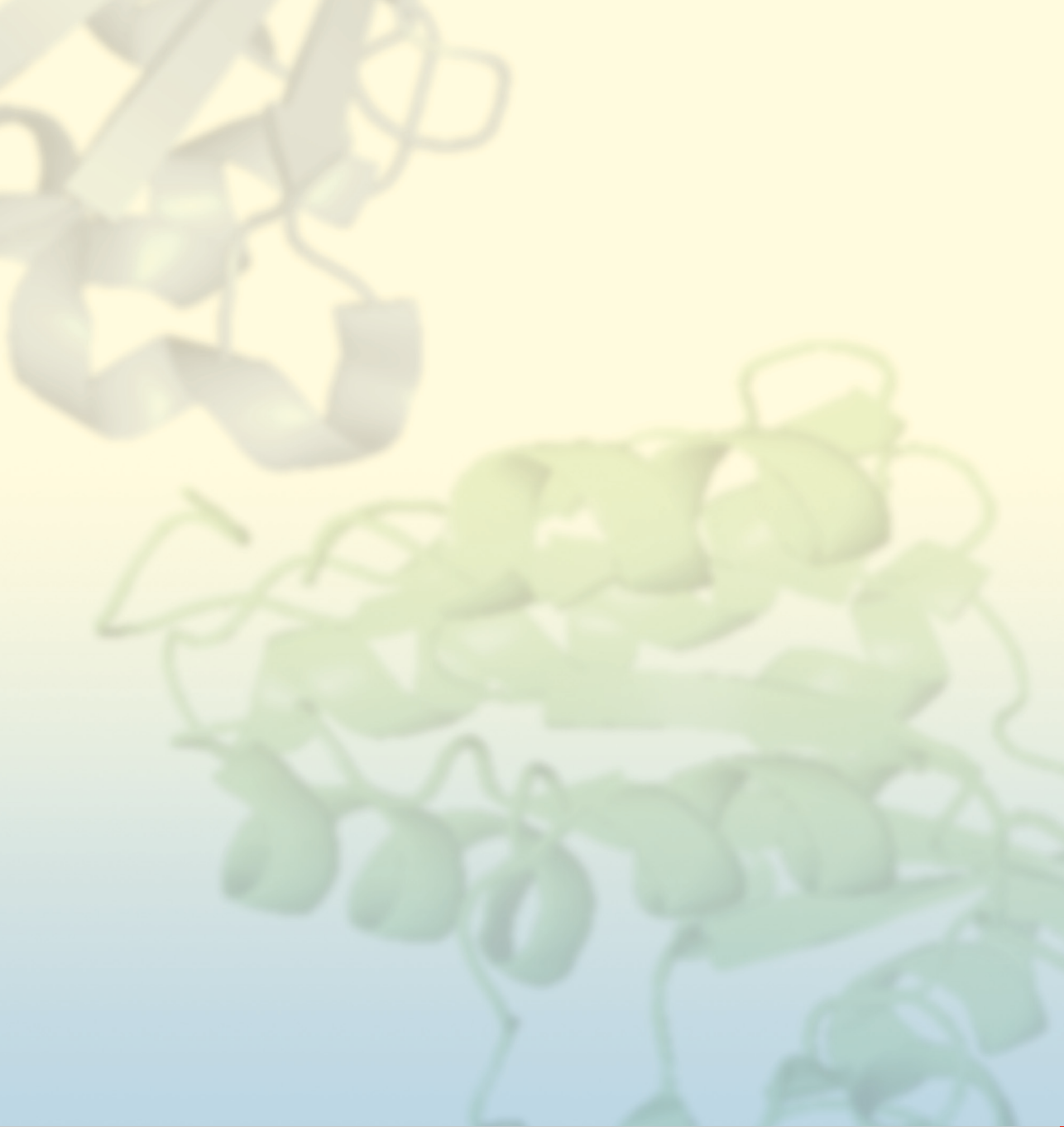
50. **Analysis of functional domains of Par-4**
by U.K. Tiruttani Subhramanyam (2012), 85 pages
ISBN: 978-3-89336-766-5

51. **Transcriptional responses and transcriptional regulators of
Gluconobacter oxydans 621H**
by S. K. Schweikert (2012), XVI, 140 pages
ISBN: 978-3-89336-780-1

52. **Characterization of the human mu opioid receptor:
Structural and functional studies of a G protein-coupled receptor**
by Y. Ma (2012), 129 pages
ISBN: 978-3-89336-767-2

53. **Optimierung der Hydroxynitril-Lyase aus *Arabidopsis thaliana* für die
enantio-selektive Synthese von (R)-Cyanhydrinen**
Entwicklung und Etablierung geeigneter Reaktionsparameter und molekulare
Stabilisierung durch rationales Enzymdesign
von D. Okrob (2012), XV, 135 Seiten
ISBN: 978-3-89336-782-5

54. **Eine kritische Evaluierung FRET-basierter Biosensoren als Werkzeuge für
die quantitative Metabolitanalytik**
von R. Moussa (2012), 113 Seiten
ISBN: 978-3-89336-792-4



Gesundheit / Health
Band / Volume 54
ISBN 978-3-89336-792-4